

Abteilung Neuroanatomie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
Medizinische Fakultät
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Anreicherung einer aktivitätsabhängigen Splice-Variante von Dynamin 1 in Synapsen in verschiedenen Regionen des Zentralen Nervensystems

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von: **Marie-Lisa Eich** geb. am: **18.09.1992** in **Neuwied**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Zusammenfassung.....	5
Summary.....	7
1 Einleitung.....	9
1.1 Einführung.....	9
1.2 Neuronales Gewebe.....	11
1.2.1 Cerebellum.....	11
1.2.1.1 Funktion	11
1.2.1.2 Anatomie.....	11
1.2.1.3 Histologischer Aufbau des cerebellären Cortexes	11
1.2.2 Neocortex.....	14
1.2.2.1 Funktion	14
1.2.2.2 Anatomie.....	14
1.2.2.3 Histologischer Aufbau.....	14
1.2.2.4 Primärer visueller Cortex.....	16
1.2.3 Retina.....	17
1.2.3.1 Funktion	17
1.2.3.2 Anatomie	17

1.2.3.3 Histologischer Aufbau.....	17
1.2.4 Rückenmark	20
1.2.4.1 Funktion	20
1.2.4.2 Anatomie	21
1.2.4.3 Graue und weiße Substanz.....	21
1.3 Endozytose	24
1.3.1 Endozytose	24
1.3.1.1 Funktion	24
1.3.1.2 Clathrin-vermittelte Endozytose (clathrin-mediated endocytosis [CME]).....	25
1.3.1.3 Aktivitätsabhängige Bulk-Endozytose (activity-dependent bulk endocytosis [ADBE])	28
1.3.2 Dynamin.....	30
2 Material und Methoden.....	35
2.1.1 Antikörper.....	35
2.1.1.1 Primärantikörper.....	35
2.1.1.2 Synthetische Peptide	36
2.1.1.3 Sekundärantikörper	37
2.1.2 Gewebe	37
2.1.3 Einbettmedium	37
2.2.1 Immunfluoreszenzmikroskopie	38
2.2.1.1 Harz-Einbettung für 0,5µm dünne Schnitte (Semidünnschnitte).....	38
2.2.1.2 Immunfluoreszenzmarkierung von Semidünnschnitten	38
2.2.1.3 Kontrollinkubationen.....	40
2.2.1.4 Präabsorptionsexperimente.....	40

2.2.1.5 Konfokalmikroskop	40
2.2.1.6 Epifluoreszenzmikroskop	41
2.2.2. SDS-PAGE und Western Blot.....	42
2.2.2.1 Proteinbestimmung mit Amidoschwarz.....	42
2.2.2.3 Western Blot.....	45
2.2.3. Dotblot-Experimente.....	47
2.2.4. Hell- und Dunkeladaptation von Mäusen	47
3 Ergebnisse.....	49
3.1.1 Dotblot Testung des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers	49
3.2.1 Western Blot Testung des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers in verschiedenen Geweben der Maus	51
3.2.2 Präabsorptionsexperimente	53
3.3.1 Lokalisation von Dynamin 1xb im Cerebellum der Maus.....	55
3.3.1.1 Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Dynamin 1xb und RIM 1/2	55
3.3.1.1 Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Dynamin 1xb und Synaptotagmin 1.....	59
3.3.1.3 Präabsorptionsexperimente zum Nachweis der Spezifität des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers im Cerebellum der Maus	61
3.3.2 Lokalisation von Dynamin 1xb in der Retina der Maus	64
3.3.2.1 Präabsorptionsexperimente zum Nachweis der Spezifität des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers in der Retina der Maus.....	66
3.3.3 Lokalisation von Dynamin 1xb im visuellen Cortex der Maus	68
3.3.3.1 Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Dynamin 1xb und Synaptotagmin 1.....	69
3.3.3.2 Präabsorptionsexperimente zum Nachweis der Spezifität des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers im visuellen Cortex der Maus.....	70
3.3.4 Lokalisation von Dynamin 1xb im Rückenmark der Maus.....	73

3.3.4.1 Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Dynamin 1xb und RIM 1/2	73
3.3.4.2 Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Dynamin 1xb und Synaptotagmin 1.....	75
3.3.4.3 Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Dynamin 1xb und β -Tubulin	76
3.3.4.4 Präabsorptionsexperimente zum Nachweis der Spezifität des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers im visuellen Cortex der Maus.....	77
3.3.5 Evaluation des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers in hell- und dunkeladaptierter Retina der Maus.....	81
4 Diskussion.....	83
5 Literaturverzeichnis.....	89
6 Abkürzungsverzeichnis.....	102
7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	104
Abbildungsverzeichnis.....	104
Tabellenverzeichnis.....	105
8 Danksagung.....	106
9 Publikationen.....	107

Zusammenfassung

Dynamine sind GTP-bindende Mechanoenzyme, die an verschiedenen Formen der Endozytose und Vesikelabschnürung beteiligt sind. Es sind drei Dynamin-Gene (Dynamin1-3) bekannt. Dynamine sind mit verschiedenen Splicevarianten an sehr unterschiedlichen Vorgängen in der Zelle beteiligt. Diese umfassen sowohl konstitutive als auch aktivitätsabhängige Prozesse. Nervenzellen besitzen einen besonders aktiven endozytotischen Membranverkehr, insbesondere in den präsynaptischen Terminalen. In den präsynaptischen Terminalen geschieht synaptische Kommunikation via Exozytose von Neurotransmitter-enthaltenden synaptischen Vesikeln, die nach der Fusion mit der präsynaptischen Plasmamembran wieder aufgenommen werden müssen. Die endozytotische Wiederaufnahme von Membranvesikeln muss dabei dynamisch an unterschiedliche Aktivitätszustände in der präsynaptischen Terminale angepasst werden. In der vorliegenden Arbeit habe ich eine spezielle, aktivitätsabhängige Splicevariante (Dynamin 1xb) von Dynamin 1, Dynamin 1xb, untersucht. Die Dynamin1 Splicevariante Dynamin1xb ist besonders interessant, da sie eine Bindungsstelle für die Ca^{2+} -abhängige Phosphatase Calcineurin besitzt (Bodmer et al., 2011). Die Ca^{2+} - und damit aktivitäts-gesteuerte Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert Dynamin1 und kann auf diese Weise Dynamin1 „anschalten“ bzw. in seiner Aktivität steigern. Diese Dynamin1xb-abhängige Form der Endozytose kann während starker neuronaler Stimulation beim Recyclen von synaptischen Vesikeln von großer Bedeutung sein. Im Rahmen dessen habe ich einen selbst hergestellten monoklonalen Antikörper (Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10)) gegen diese Ca^{2+} -regulierte, aktivitätsabhängige Splicevariante von Dynamin 1 charakterisiert.

Mit Hilfe des hergestellten monoklonalen Antikörpers, der spezifisch Dynamin1xb erkennt, konnte ich Dynamin 1xb mittels Western Blot in verschiedenen zentralnervösen Geweben

nachweisen: Cerebellum, Neocortex, Rückenmark und Retina. Dynamin1xb war dagegen in nicht neuronalem Gewebe, wie Niere und Darm, abwesend, wie ich mittels Western-Blot-Untersuchungen gezeigt habe. Die Spezifität des Antikörpers wurde mithilfe von Präabsorptionsexperimenten gezeigt. Die Präabsorption des Antikörpers mit dem spezifischen Dynaminpeptid, gegen welches der Antikörper gerichtet ist, führte sowohl in Western Blot-Untersuchungen als auch in Immunfluoreszenzexperimenten zu einem Verschwinden des Immunsignals.

Um Dynamin 1xb genau lokalisieren zu können, verwendete ich den hergestellten, Dynamin1xb-spezifischen monoklonalen Antikörper (Anti-Dynamin1xb (Klon 1E10)) in der Immunfluoreszenzmikroskopie (konventionelle Epifluoreszenzmikroskopie und Konfokalmikroskopie) und untersuchte mit dieser Methode verschiedene Gewebe. Dabei zeigte sich, dass Dynamin 1xb im Cerebellum, im Rückenmark und im visuellen Cortex in der grauen Substanz angereichert ist, und zwar dort, wo sich die Synapsen befinden. Die weiße Substanz zeigte im Vergleich dazu ein nur sehr schwach ausgeprägtes Dynamin 1xb Immunsignal. Dynamin 1xb wies in Cerebellum und visuellem Cortex außerdem ein ähnliches Expressionsmuster wie die synaptischen Vesikelproteine SV2 und Synaptotagmin 1 sowie das aktive Zonen-Protein RIM1/2 auf. In der Retina wurde Dynamin 1xb in den Ribbonsynapsen der Photorezeptoren und in der Synapsenschicht zwischen den Bipolar- und Ganglienzellen nachgewiesen, welches durch Doppelimmunfluoreszenzinkubationen mit einem Protein der Ribbonsynapsen, RIBEYE, bestätigt wurde. In Photorezeptor-Ribbonsynapsen war das Dynamin 1xb Signal besonders stark in der peri-aktiven Zone in unmittelbarer Nachbarschaft zu den synaptischen Ribbons. Zusammenfassend wurde Dynamin 1xb in allen synaptischen Schichten aller ausgetesteten Abschnitte des ZNS (cerebellären und visuellen Cortex, graue Substanz des Rückenmarks, OPL und IPL der Retina) gefunden und ist dort wahrscheinlich an der aktivitäts-abhängigen, Ca^{2+} -regulierten Endozytose beteiligt. Eine Beteiligung von Dynamin 1xb an der aktivitätsabhängigen Endozytose in der präsynaptischen Terminale wird auch durch vergleichende semiquantitative Untersuchungen synaptischer Dynamin 1xb Immunsignale an hell- und dunkel-adaptierten Netzhäuten der Mausretina weiter gestützt.

Summary

„The calcineurin-binding, activity-dependent splice variant dynamin 1xb is highly enriched in synapses in various regions of the central nervous system”

Dynamins are GTP-binding mechanoenzymes involved in different types of endocytosis and vesicle scission. Three dynamin genes (dynamin 1-3) are known. Dynamins are with their different splice variants involved in different cellular processes. These include constitutive as well as activity-dependent processes. Neurons possess a particular active endocytotic membrane traffic, especially in the presynaptic terminals. In the presynaptic terminal synaptic communication via exocytosis of neurotransmitter-containing synaptic vesicles takes place. These vesicles need to be retrieved after fusion with the plasma membrane. Furthermore, endocytosis needs to be adopted to different levels of synaptic activity in the presynaptic terminal. In the present study, I examined a particular activity-dependent splice variant (dynamin 1xb) of dynamin 1. This dynamin 1xb splice variant is unique because it can directly interact with the calcium- and calmodulin-dependent phosphatase calcineurin (Bodmer, Ascaño, und Kuruvilla 2011). The calcium and therefore activity-dependent phosphatase calcineurin dephosphorylates dynamin 1 and is able to “turn on” dynamin 1 or to enhance its activity. This dynamin 1xb dependent endocytosis can have a strong impact on vesicle recycling during high levels of synaptic activity. For this purpose, I characterized a new mouse monoclonal antibody (anti-dynamin1xb (clone 1E10)) against this Ca^{2+} -regulated, activity-dependent splice variant of dynamin 1.

In parallel to localization analyses of dynamin 1xb in different neuronal tissue, I found in western blot experiments, that dynamin 1xb is highly expressed in cerebellum, neocortex,

spinal cord, and retina. The antibody's specificity was tested by performing pre-absorption experiments by incubating the dynamin peptide or a control peptide with the monoclonal antibody clone 1E10. Later on, pre-absorbed antibody was tested in western blot analyses and in immunofluorescence experiments where pre-absorbed antibody produced no signal. Furthermore specificity of antibody was confirmed by checking non-neuronal tissues like kidney and intestine where no immune reactivity was detected, when the dynamin 1xb antibody was preabsorbed with the dynamin peptide; while the immunoreactivity remained unchanged.

To localize dynamin 1xb, I performed conventional epifluorescence microscopy and confocal microscopy. I found that dynamin 1xb is enriched in the grey matter of cerebellum, visual cortex and spinal cord, where synapses are localized. All three layers of the cerebellar cortex expressed dynamin 1xb. Markedly strong signals were detected in the cerebellar glomeruli of the granular layer. Likewise all layers of the visual cortex expressed dynamin 1xb. In spinal cord dynamin 1xb was highly enriched in the grey matter, equally distributed with synaptotagmin 1 and RIM 1/2, whereas tubulin was expressed in the grey and predominantly in the white matter. In contrast only a very weak dynamin 1xb immunosignal was detected in the fiber tracts of white matter of the cerebellum and spinal cord. Dynamin 1xb displayed a similar expression profile as the synaptic vesicle proteins SV2 and synaptotagmin 1 as well as the active zone protein RIM 1/2 in cerebellum and visual cortex. In retina dynamin 1xb was detectable in the outer and in the inner plexiform layer. In the photoreceptor ribbon synapses the dynamin 1xb signal was particularly strong in the peri-active zone in close vicinity to the synaptic ribbons, proved by double immunofluorescence staining with RIBEYE. Taken together dynamin 1xb was found to be enriched in all layers of the cerebellar and the visual cortex, in the grey matter of the spinal cord, and in OPL and IPL of the retina playing a role in the activity-dependent, Ca^{2+} -regulated endocytosis. An involvement of dynamin 1xb in activity-dependent endocytosis is further supported by semi quantitative evaluation of synaptic dynamin 1xb immunosignals between light- and dark-adapted retinas.

1 Einleitung

1.1 Einführung

Dynamin, das zentrale Protein dieser Doktorarbeit, ist ein wichtiges Protein im Prozess der Aufnahme von Stoffen in die Zelle (Endozytose). Vor allem in der Clathrin vermittelten Endozytose, eine der Hauptformen der Endozytose, ist Dynamin ein entscheidender Akteur. Aber nicht nur dort entfaltet Dynamin seine einzigartigen Funktionen. Generell sind Dynamin und die Familie der Dynamin-Proteine zahlreichen Splicevorgängen unterworfen, um so ganz unterschiedliche Aufgaben an verschiedensten Stellen der Zelle zu erfüllen (Liu et al. 2008; McNiven et al. 2000). Viele Details in diesen Vorgängen sind noch ungeklärt und Gegenstand aktueller Forschung. In dieser Doktorarbeit habe ich mir eine dieser Splicevarianten aus der Dynamin 1 Genfamilie vorgenommen, Dynamin 1xb. Neuere Studien konnten zeigen, dass diese Splicevariante aufgrund seiner Bindungsstelle für die Calcium- und damit aktivitätsregulierte Phosphatase Calcineurin eine Schlüsselrolle in der aktivitätsabhängigen Bulk-Endozytose spielt (Xue et al. 2011; Bodmer, Ascaño, und Kuruvilla 2011). Diese Form der Endozytose ist besonders bei erhöhter Aktivität von Neuronen von sehr großer Bedeutung, um verstärkt Membranen wieder aufzunehmen, die im Rahmen verstärkter Exozytose mit der Plasmamembran fusioniert wurden und um damit zur Membranhomöostase beizutragen.

Der Vorgang der Endozytose hat eine Schlüsselfunktion in der Zellkommunikation, aber auch in verschiedensten anderen Vorgängen im Körper, wie z.B. der Immunantwort, der Nahrungsaufnahme und des Zellwachstums- und der Zelldifferenzierung (Ferguson und De Camilli 2012). Dementsprechend kann es bei Fehlern und Krankheiten in diesem Prozess zu

unterschiedlichsten Störungen kommen (Singh, Jadhav, und Bhatt 2017; Ellinger und Pietschmann 2016).

Das Nervengewebe zählt zu den vier Grundgeweben des Körpers. Neurone besitzen die einzigartige Funktion der Erregungsleitung und Erregungsübertragung. Exemplarisch wurde sich in der folgenden Doktorarbeit auf vier Nervengewebe konzentriert: Cerebellum, Neocortex, Retina und Rückenmark.

Ziel dieser Arbeit war die Erprobung eines selbst hergestellten monoklonalen Antikörpers gegen Dynamin 1xb (Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10)), einer speziellen Splicevariante der neuronalen Isoform von Dynamin 1, in verschiedenen Geweben der Maus sowie eine genaue Lokalisation des Proteins mittels Immunfluoreszenzmarkierungen.

1.2 Neuronales Gewebe

1.2.1 Cerebellum

1.2.1.1 Funktion

Das Cerebellum ist ein wichtiges Integrationszentrum für die Planung, die Koordination und die Feinabstimmung von Bewegungsabläufen. Bei Ausfällen des Kleinhirns kann es klinisch zu folgenden Störungsbildern kommen: Ataxie, Fallneigung, Dysdiadochokinese, Nystagmus, Intentionstremor, Dysmetrie, Asynergie, skandierende Sprache und Rebound-Phänomen (zur weiteren Übersicht siehe Lehrbücher der Anatomie wie Trepel 2015; Aumüller et al. 2014).

1.2.1.2 Anatomie

Das Cerebellum befindet sich in der hinteren Schädelgrube. Es gliedert sich in zwei Hemisphären, den Kleinhirnwurm (Vermis), den Lobus flocculonodularis und die beiden Kleinhirntonsillen. Über die Kleinhirnstiele (Pedunculi cerebellares) ist das Kleinhirn afferent und efferent mit anderen Hirnregionen verbunden. Die Kleinhirnsiegel, die zu Mesencephalon und Medulla oblongata ziehen, bilden das Dach des 4. Ventrikels. Im Marklager befinden sich die Kleinhirnkerne. Die Oberfläche des Cerebellums wird durch viele Windungen (Folia) vergrößert. Trotz seiner vergleichbar geringen Größe enthält das Kleinhirn ca. 50% aller Neurone des menschlichen Körpers (zur Übersicht über Anatomie und histologischen Aufbau des Cerebellums siehe (Trepel 2015; Sillitoe, Fu, und Watson 2012)).

1.2.1.3 Histologischer Aufbau des cerebellären Cortexes

Der cerebelläre Cortex gliedert sich in drei Schichten (von innen nach außen): das Stratum granulosum, das Stratum purkinjense und das Stratum moleculare (siehe Abbildung 1).

Die beiden großen afferenten Systeme zum cerebellären Cortex sind die Moosfasern und die Kletterfasern. Die Kletterfasern kommen vom kontralateralen inferioren Olivenkernkomplex der Medulla oblongata. Sie bilden Synapsen an den proximalen Dendriten der Purkinje-Zellen. Die Moosfasern haben ihren Ursprung im Rückenmark, im Hirnstamm und in dem Pons. Ihre Axone enden mit Synapsen an den Dendriten der Körnerzellen und bilden dort zusammen mit den Axonterminalen der Golgi-Zellen die Glomeruli cerebellares. Die Axone der Körnerzellen wiederum projizieren sich in die Molekularschicht, wo sie sich in Parallelfasern aufgabeln und Synapsen mit dem Dendritenbaum der Purkinje-Zellen bilden (Sillitoe, Fu, und Watson 2012). Die Golgi-Zellen bilden funktionell ein negatives Rückkopplungssystem für die Körnerzellen.

Die Purkinje-Zellen stellen die einzigen Efferenzen der Kleinhirnrinde dar. Ihre Axone projizieren zu den Kleinhirnkernen, ein gewisser Anteil aber auch direkt zu den Vestibulariskernen. Die Purkinje-Zellen erhalten ihre Afferenzen von gabaergen Kletterfasern, von den glutamatergen Parallelfasern der Körnerzellen, sowie von den gabaergen Korbzellen und Sternzellen. Korbzellen und Sternzellen sind inhibitorische Interneurone des cerebellären Cortexes. Sie befinden sich in der Molekularschicht, wo sie Efferenzen an die Purkinje-Zellen senden. Ihre Afferenzen erhalten die Korb- und Sternzellen von den Körnerzellen.

Die Gliazellen des cerebellären Cortexes sind die Bergmann Gliazellen. Sie sind nur im Cerebellum vorhanden. Ihre Somata befinden sich in der Purkinje-Zell-Schicht. Sie spielen eine aktive Rolle in der Entwicklung und in neuronalen Kommunikationsvorgängen (Sillitoe, Fu, und Watson 2012).

Die einzelnen Zellen des cerebellären Cortexes, ihre zugehörige Schicht, ihr Neurotransmitter und ihre afferenten und efferenten Projektionen spiegelt Tabelle 1. Zellen des cerebellären Cortexes wider.

Die Abbildung 1. Schema des Aufbaus der Kleinhirnrinde verdeutlicht die oben beschriebenen Verschaltungen innerhalb des cerebellären Cortexes.

TABELLE 1. ZELLEN DES CEREBELLÄREN CORTEXES

ZELLTYP	SCHICHT	TRANSMITTER	AFFERENTE PROJEKTION	EFFERENTE PROJEKTION
Purkinje-Zelle	Stratum purkinjense	GABA	Kletterfasern Körnerzellen Korbzellen Sternzellen	Kleinhirnkern z.T. auch direkt zu den Nuclei vestibulares
Körnerzelle	Stratum granulosum	Glutamat	Moosfasern Golgi-Zellen	Purkinje-Zellen Golgi-Zellen
Golgi-Zelle	Stratum granulosum	GABA	Körnerzellen Moosfasern	Körnerzellen
Korbzelle	Stratum moleculare	GABA	Körnerzellen	Purkinje-Zellen
Sternzelle	Stratum moleculare	GABA	Körnerzellen	Purkinje-Zellen
Unipolare Bürstenzelle	Stratum granulosum	Glutamat	Moosfasern	Körnerzellen Unipolare Bürstenzellen
Lugarozelle	Stratum granulosum	Glycin/GABA		Korbzellen Sternzellen Körnerzellen

Tabelle modifiziert nach (Trepel 2015; Sillitoe, Fu, und Watson 2012)

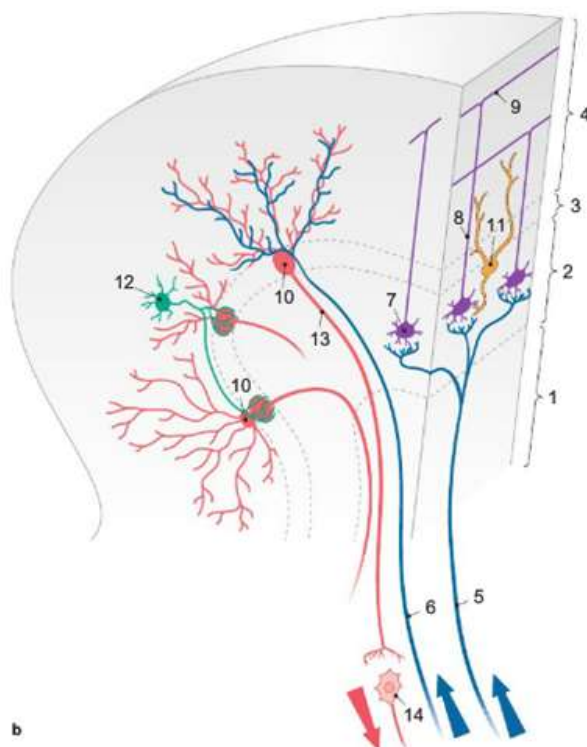


Abbildung 1. Schema des Aufbaus der Kleinhirnrinde

1 Marklager 2 Stratum granulosum 3 Stratum purkinjense 4 Stratum moleculare
5 Moosfasern 6 Kletterfasern 7 Körnerzellen 8 Axone der Körnerzellen 9 Parallelfasern 10 Purkinje-Zelle 11 Golgi-Zelle 12 Korbzellen 13 Axone der Purkinje-Zellen 14 Neurone der Kleinhirnkern

(Abbildung aus Trepel 2015)

1.2.2 Neocortex

1.2.2.1 Funktion

Der Neocortex ist der phylogenetisch jüngste Teil des Gehirns und das übergeordnete Zentrum für sensorischen Input und spezifisches Verhalten. Bei Verletzungen oder Ausfällen beispielsweise durch einen Apoplex kann es zu verschiedenen und zum Teil komplexen Ausfallerscheinungen kommen (zur weiteren Übersicht siehe Lehrbücher der Anatomie wie Trepel 2015; Aumüller et al. 2014).

1.2.2.2 Anatomie

Der Neocortex liegt der vorderen und mittleren Schädelgrube auf. Er teilt sich in zwei Hemisphären. Makroskopisch lässt sich eine Hemisphäre in vier Lappen teilen: den Lobus frontalis, den Lobus parietalis, den Lobus temporalis und den Lobus occipitalis.

Die Oberfläche ist durch zahlreiche Gyri und Sulci vergrößert.

Funktionell kann der Neocortex in Primärfelder (erhalten direkte Sinnesafferenzen vom Thalamus), Sekundärfelder (Zuordnung der Sinnesinformation) und Assoziationsfelder (afferente und efferente Verbindung mit zahlreichen Primär- und Sekundärfeldern) eingeteilt werden.

(Zur genaueren Übersicht über Anatomie und histologischen Aufbau siehe Lehrbücher der Anatomie wie (Trepel 2015; Aumüller et al. 2014))

1.2.2.3 Histologischer Aufbau

Der Neocortex kann sich histologisch in 6 Schichten untergliedern lassen (siehe Abbildung 2):

- Lamina molecularis (I) liegt direkt unter der Pia mater und besitzt eine geringe Zelldichte. Lamina I besteht vor allem aus tangential verlaufenden Fasern aus

Fortsätzen von Zellen dieser und anderer Cortexschichten. Die vorhandenen Zellen sind Nicht-Pyramidenzellen.

- Lamina granularis externa (II) besteht überwiegend aus kleinen Pyramiden- und Sternzellen. Sie besitzt eine hohe Zelldichte.
- Lamina pyramidalis externa (III) besitzt eine hohe Zelldichte und beinhaltet größtenteils große Pyramidenzellen. Die axonalen Fortsätze der Zellen bilden den Großteil der Assoziations- und Kommissurenfasern.
- Lamina granularis interna (IV) ist besonders in sensorischen oder sensiblen Cortexbereichen ausgeprägt. Hier kommen vorwiegend kleine Pyramidenzellen bei hoher Zelldichte vor. Außerdem enden und verzweigen sich hier thalamocorticale Afferenzen und bilden den Baillarger-Streifen. Des Weiteren enthält Lamina IV apikale Dendriten von Pyramidenzellen der Lamina VI (Escobar et al. 1986).
- Lamina pyramidalis interna (V) bildet das Hauptefferenzsystem des Cortexes. In den meisten Cortexarealen besitzt Lamina V allerdings nur assoziative Funktionen. Im primären motorischen Cortex hingegen bilden die hier überwiegend vorkommenden Betz-Riesenpyramidenzellen mit ihren axonalen Fortsätzen den Großteil der Efferenzen des Cortexes zu tieferen Hirnregionen wie Basalganglien, Hirnstamm und Rückenmark, nicht aber zum Thalamus. Lamina V beinhaltet außerdem Axonkollateralen der Neurone aus den Laminar II, III und V. Sie ist vor allem in motorischen Cortexbereichen ausgeprägt.
- Lamina multiformis (VI) besitzt eine mäßige Zelldichte. Die axonalen Fortsätze der kleinen Pyramidenzellen bilden den Großteil der Efferenzen des Cortexes zum Thalamus.

(Trepel 2015; Kirkcaldie 2012; Aumüller et al 2014)

Obwohl Maus und Mensch ähnliche Schichtaufteilungen und Neurone mit ähnlichen Eigenschaften im Neocortex besitzen, gibt es einige Unterschiede (zur Übersicht siehe Kirkcaldie 2012). In der Maus zählen Lamina II und III als eine Schicht. Sie ist dünner und weniger differenziert als Lamina II und III im menschlichen Neocortex (DeFelipe, Alonso-Nanclares, und Arellano 2002). Außerdem existiert in der Maus eine zellarme, dünne Lamina

VII mit Projektionen in Lamina I und Verbindungen durch das Corpus callosum zur anderen Hemisphäre (Mitchell und Macklis 2005). Generell sind die Neurone im Mauscortex extrem dicht gepackt (Schüz und Palm 1989).

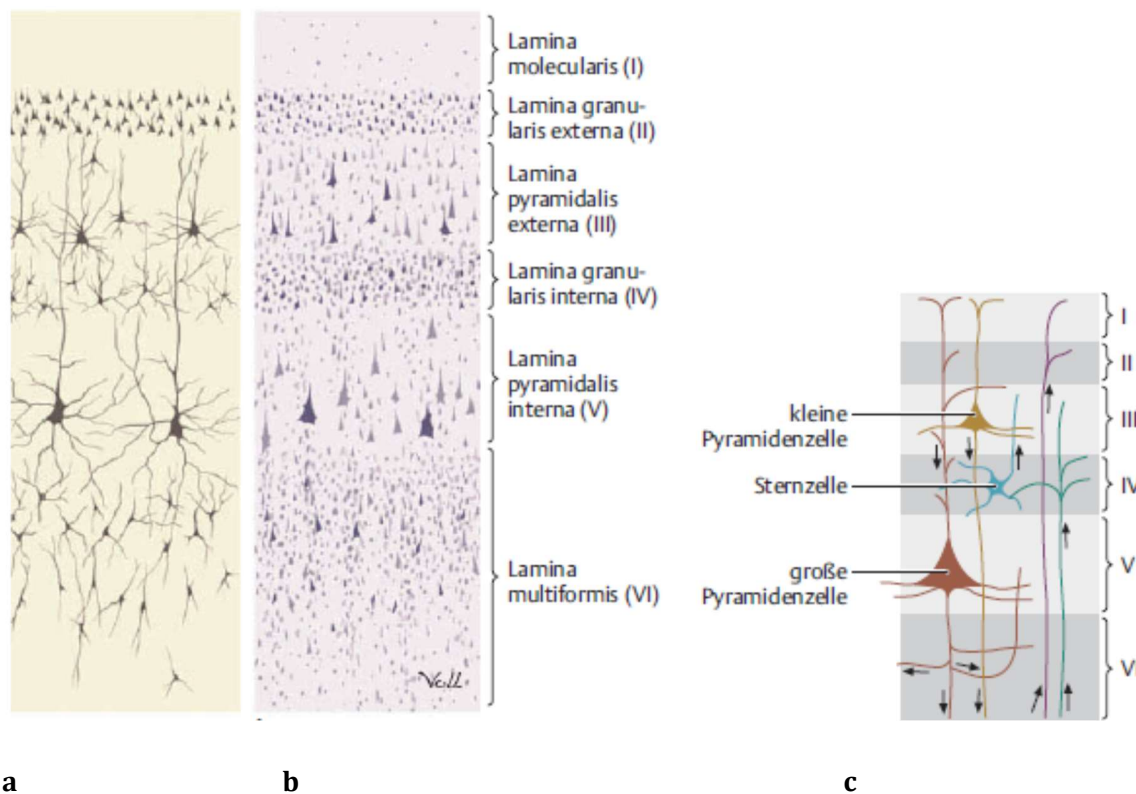


Abbildung 2. Schematischer Aufbau des Neocortexes

a Schichten des Neocortexes in einer Silberfärbung

b Schichten der Großhirnrinde in der Zeldarstellung nach Nissl

c schematische Darstellung der wichtigsten Neuronentypen innerhalb des Neocortex

(Aumüller u. a. 2014)

1.2.2.4 Primärer visueller Cortex

Der primäre visuelle Cortex befindet sich im Okzipitallappen der Großhirnrinde. Histologisch ist der primäre visuelle Cortex wie der restliche Neocortex aufgebaut und besteht aus den oben beschriebenen sechs Schichten. Über den Signalweg von Retina über Nervus opticus, Tractus opticus, Corpus geniculatum laterale und Sehstrahlung ist der

primäre visuelle Cortex in das visuelle System eingebunden. Als Besonderheit enthält der primär visuelle Cortex eine besonders dicke Schicht IV. Hier enden viele afferente Neurone aus dem Corpus geniculatum laterale (Aumüller et al. 2014).

1.2.3 Retina

1.2.3.1 Funktion

Die Retina dient der Lichtwahrnehmung und der anschließenden Reizweiterleitung über den Nervus opticus in übergeordnete Hirnzentren. Die Retina steht also am Anfang des Sehvorgangs. Dem entsprechend kann es bei Erkrankungen der Retina zu Sehstörungen kommen (zur weiteren Übersicht siehe Lehrbücher der Anatomie wie Trepel 2015; Aumüller et al. 2014).

1.2.3.2 Anatomie

Der Augapfel liegt in der Orbita und besteht aus drei Schichten. Die äußere Schicht (Tunica fibrosa bulbi) besteht aus der Sklera und der lichtdurchlässigen Cornea. Dann folgt die mittlere Schicht (Tunica vasculosa bulbi, Uvea) mit Iris, Corpus ciliaris und Choroidea. Die innerste Schicht (Tunica interna bulbi) bildet die Retina. Sie wiederum kann in zwei Anteile unterteilt werden: die Pars caeca („blinde“ Retina) und die Pars optica („lichtempfindliche, sehende“ Retina). Die Pars caeca enthält nur das Pigmentepithel und legt sich dem Corpus ciliaris und der Iris an. Die Pars optica setzt sich aus einem äußeren Stratum pigmentosum und einem aus Sinnes- und Nervenzellen bestehenden inneren Stratum nervosum zusammen (Zur Übersicht über Anatomie und histologischen Aufbau der Retina siehe Trepel 2015; Chalupa and Williams 2008).

1.2.3.3 Histologischer Aufbau

Die Pars optica der Retina besteht histologisch aus 10 Schichten (siehe Abbildung 3):

1. Pigmentepithelschicht (Stratum pigmentosum retinae [RPE])

-
2. Photorezeptorenschicht (Stratum neuroepitheliale retinae), mit Außensegment (Outer Segment [OS], Stratum segmentorum externum) und Innensegment (Inner Segment [IS], Stratum segmentorum internum)
 3. Äußere Grenzmembran (Membrana limitans externa, Outer Limiting Membrane [OLM])
 4. Äußere Körnerschicht (Stratum nucleare externum, Outer Nuclear Layer [ONL])
 5. Äußere plexiforme Schicht (Stratum plexiforme externum, Outer Plexiform Layer [OPL])
 6. Innere Körnerschicht (Stratum nucleare internum, Inner Nuclear Layer [INL])
 7. Innere plexiforme Schicht (Stratum plexiforme internum, Inner Plexiform Layer [IPL])
 8. Ganglienzellschicht (Stratum ganglionare retinae, Ganglion Cell Layer [GCL])
 9. Nervenfaserschicht (Stratum neurofibrarum, Optic Fiber Layer [OFL])
 10. Innere Grenzmembran (Membrana limitans interna, Inner Limiting Membrane [ILM])

Die fünf wichtigsten Neurontypen in der Retina sind die Photorezeptoren, die Bipolarzellen, die Ganglienzellen, die Horizontalzellen und die amakrinen Zellen.

Der schematische Aufbau der Retina ist in Abbildung 3 dargestellt. Der Lichteinfall erfolgt in der entgegengesetzten Richtung zur neuronalen Impulsweiterleitung. Die Photorezeptoren registrieren das einfallende Licht. Ihre Außen- und Innensegmente liegen im Stratum neuroepitheliale retinae, wobei ihre Perikaryen im Stratum nucleare externum (ONL) liegen. Die Weiterleitung des Lichtreizes erfolgt durch synaptische Umschaltung auf die Bipolarzellen im Stratum plexiforme externum (OPL). Ihre Perikaryen befinden sich im Stratum nucleare internum (INL). Die Bipolarzellen wiederum bilden im Stratum plexiforme internum (IPL) synaptische Kontakte mit den Ganglienzellen. Im Stratum ganglionare (GCL) liegen die Zellkörper der Ganglienzellen. Ihre Axone verlaufen weiter im Stratum neurofibrarum und verlassen gemeinsam als Nervus opticus die Retina an der Papilla nervi optici. Die Retina wird durch zwei Grenzmembranen unterteilt: die Membrana limitans externa (OLM) und die Membrana limitans interna (ILM).

Die Horizontalzellen und die amakrinen Zellen bilden die Interneurone der Retina. Ihre Aufgabe besteht in der horizontalen Verschaltung der einzelnen Neurone. Die Perikaryen der amakrinen Zellen liegen in der INL. Sie erhalten ihre Afferenzen von den Bipolarzellen und projizieren zu den Ganglienzellen. Die Horizontalzellen befinden sich an der Grenze von OPL zu INL. Sie erhöhen zusammen mit den Bipolarzellen durch den Vorgang der lateralen Inhibition den Kontrast, sodass Objekte besser detektiert werden können (Watson 2012).

Die Müller-Zellen bilden die Gliazellen der Retina. Ihre Fortsätze reichen vom Stratum ganglionare zum Übergang von Innensegment und Zellkörper der Photorezeptoren (Haverkamp und Wässle 2000), wo sie mit den Photorezeptoren Zonulae adhaerentes ausbilden (lichtmikroskopische Korrelat = Membrana limitans externa).

Im menschlichen Auge gibt es in der Retina eine Stelle des schärfsten Sehens, die sogenannte Fovea centralis. An dieser Stelle gibt es nur Zapfen, aber keine Stäbchen. Weiterhin liegt an dieser Stelle eine 1:1:1 Verschaltung von Zapfen auf Bipolarzellen auf Ganglienzellen vor. In der Retina der Maus existiert nur ein vergleichbares Korrelat, die Area centralis mit höherer Dichte von Stäbchen und Zapfen als in der Peripherie (Laemey, Protti, Dreher 2008).

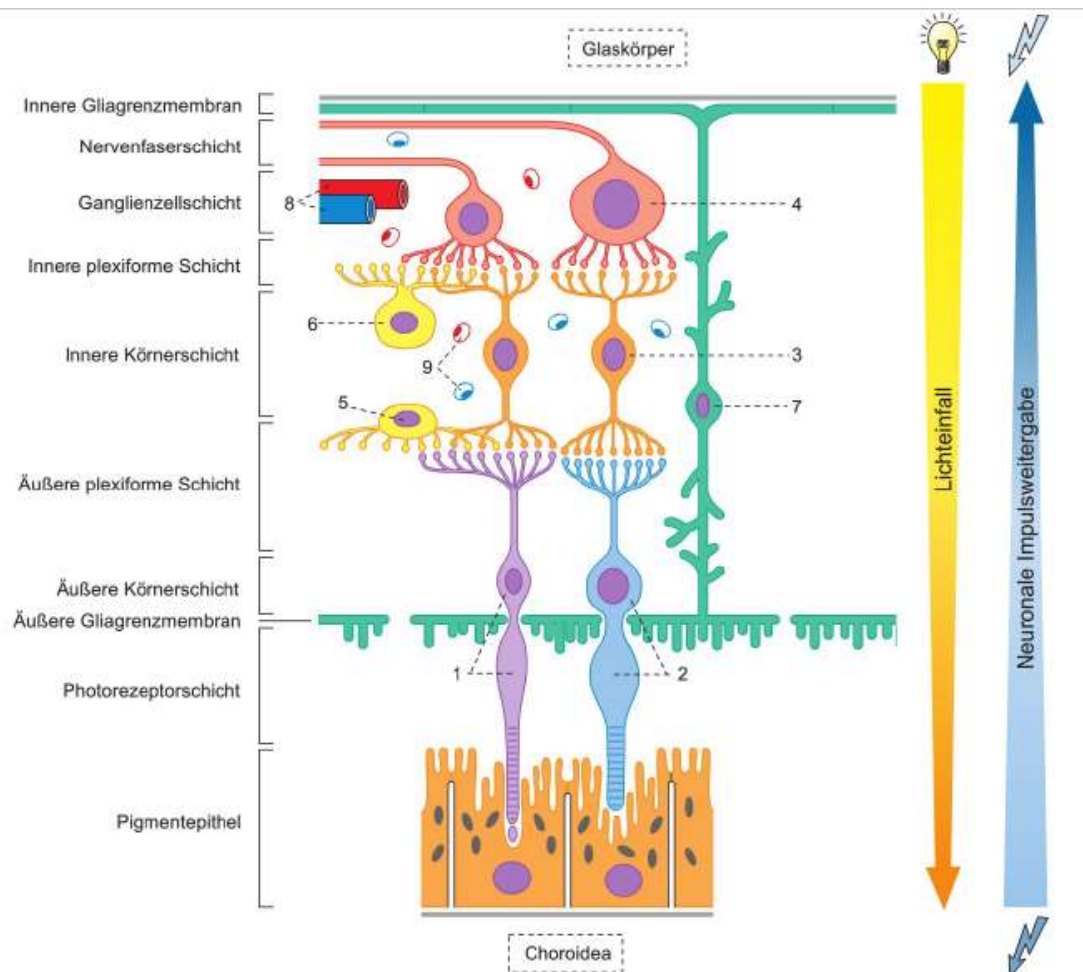


Abbildung 3. Die wichtigsten Zellen der Retina mit ihren Verbindungen

1 Stäbchenzellen 2 Zapfenzelle 3 Bipolarzelle 4 Ganglienzellen 5 Horizontalzellen 6 amakrine Zellen 7 Müller-Zellen 8 Blutgefäße der Retina 9 Kapillaren (Abbildung aus Trepel 2015)

1.2.4 Rückenmark

1.2.4.1 Funktion

Das Rückenmark zählt zum zentralen Nervensystem. Es leitet sensible Informationen vom peripheren Nervensystem ins Gehirn und umgekehrt motorische Informationen in die Peripherie. Eine Läsion des Rückenmarks kann zu verschiedensten Pathologien im

sensiblen, motorischen und autonomen Nervensystem führen (zur weiteren Übersicht siehe Lehrbücher der Anatomie wie Trepel 2015; Aumüller et al. 2014).

1.2.4.2 Anatomie

Das Rückenmark befindet sich im Spinalkanal. Es reicht vom Ende des Hirnstamms im Foramen magnum bis zum Lendenwirbelkörper 1-2 beim erwachsenen Menschen. Bei der Maus ist der kaudalste Punkt des Rückenmarks am 6. Lendenwirbelkörper zu finden. Am distalen Punkt, dem Conus medullaris, geht das Rückenmark in das Filum terminale über.

Das Rückenmark ist von Hirnhäuten umgeben und von Liquor cerebrospinalis umspült.

Die Aufteilung des Rückenmarks erfolgt in fünf Abschnitte: 8 zervikale Segmente, 12 thorakale Segmente, 5 lumbale Segmente, 5 sakrale Segmente und 1 coccygeales Segment. Das Rückenmark der Maus besitzt abweichend zum Menschen 8 zervikale, 13 thorakale, 6 lumbale, 4 sakrale und 3 coccygeale Segmente (Sengul und Watson 2012).

Aus den jeweiligen Rückenmarksegmenten treten die Spinalnervenpaare aus, um motorisch die Peripherie zu innervieren. Die sensiblen Informationen ziehen wiederum über die Spinalnerven in die jeweiligen Rückenmarkssegmente und dann zu übergeordneten Hirnzentren. Das Rückenmark besitzt außerdem zwei Verdickungen: die Intumescentia cervicalis und die Intumescentia lumbosacralis. Diese Verdickungen stellen die Abgänge der Spinalnerven zur Innervation der Extremitäten dar.

(Zur genaueren Übersicht der Anatomie siehe Trepel 2015)

1.2.4.3 Graue und weiße Substanz

Das Rückenmark lässt sich in graue und weiße Substanz unterteilen. Die Anteile an grauer und weißer Substanz variieren in den einzelnen Rückenmarksabschnitten.

Die weiße Substanz umgibt die graue Substanz von außen. Sie enthält aufsteigende und absteigende Faserbahnen und Gliazellen. Die wichtigsten sensiblen Bahnen sind die Tractus

spinothalamici (Schmerz-, Temperatur- und grobe Tastempfindung), die Hinterstrang- (Exterozeption und Propriozeption) und die Kleinhirnseitenstrangbahnen (Propriozeption des Bewegungsapparats). Die wichtigste motorische Bahn ist die Pyramidenbahn. Sie ist für die motorische Innervation vor allem der distalen Skelettmuskulatur zuständig. Die extrapyramidalmotorischen Systeme wie der Tractus rubrospinalis, der Tractus vestibulospinalis und der Tractus reticulospinalis sind vorwiegend für die Innervation der proximalen Skelettmuskulatur verantwortlich (Trepel 2015).

Die graue Substanz besteht größtenteils aus Nervenzellkörpern. Sie enthält aber auch unmyelinisierte Axone und einen kleinen Anteil myelinierter Fasern. Hier erfolgt die Umschaltung der Neurone durch synaptische Kontakte. Im Querschnitt besitzt die graue Substanz die Form eines Schmetterlings. Sie lässt sich in Vorder- und Hinterhorn aufteilen. Zwischen Th1 und L2 sowie S1 und S2 existiert in der Maus außerdem ein Seitenhorn. (Sengul und Watson 2012). Beim Menschen erstreckt sich das Seitenhorn von C8 bis L3. Die graue Substanz kann in Kerngebiete oder in Laminae nach Rexed unterteilt werden (siehe Abbildung 4). In der Einteilung nach Rexed werden zehn Laminae unterschieden. Dabei zählen die Laminae I bis VI zum Hinterhorn, die Lamina VII und funktionell die Lamina X zum Seitenhorn und die Laminae VIII und IX zum Vorderhorn.

- Lamina I bildet den dorsalen Teil des Hinterhorns. Hier werden Nozizeption und Temperaturempfinden verschaltet (Christensen und Perl 1970).
- Lamina II (Substantia gelatinosa) besteht aus zahlreichen Interneuronen mit Kollateralen in tiefere Schichten des Hinterhorns. Sie leitet ebenfalls nozizeptive und thermozeptive Afferenzen (Sengul und Watson 2012). Diese und die nozizeptiven Afferenzen aus Lamina I können von höheren Hirnzentren beeinflusst werden (Trepel 2015).
- Lamina III und IV enthalten den Nucleus proprius. Er ist Ziel für propriozeptive Afferenzen aus dem Bewegungsapparat.
- Lamina V und VI enthalten den Nucleus dorsalis. Er ist nur im Thorakalmark klar abgrenzbar und empfängt überwiegend propriozeptive Afferenzen. Die Reizweiterleitung erfolgt über den Tractus spinothalamicus.

- Lamina VII enthält zahlreiche Kerne. Der wichtigste Vertreter ist der Nucleus intermediolateralis. Er enthält das erste sympathische Neuron und reicht von C8-L3 (Th1-L2 in der Maus (Sengul, Puchalski, und Watson 2012)). Im Bereich des Sakralmarks befinden sich parasympathische Kerngebiete. Außerdem beinhaltet die Lamina VII auch Neurone, die an der Verschaltung viszerosensibler Afferenzen beteiligt sind. Im Zervikalmark sind keine vegetativen Neurone enthalten.
- Lamina VIII enthält Neurone, die den α -Motoneuronen ähneln (Sengul, Puchalski, und Watson 2012). Die Axone der Neurone bilden den propriospinalen Trakt. Einige Neurone projizieren in das kontralaterale Vorderhorn (Kommissurenfasern). Die Neurone der Lamina VIII in der Maus spielen eine Rolle in der Koordination von Bewegungen (Sengul und Watson 2012).
- Lamina IX enthält die Perikaryen der großen α -Motoneurone. Ihre Axone innervieren die Skelettmuskulatur. Außerdem enthält Lamina IX γ -Motorneurone, die den Muskelspindelapparat innervieren, und β -Motorneurone.

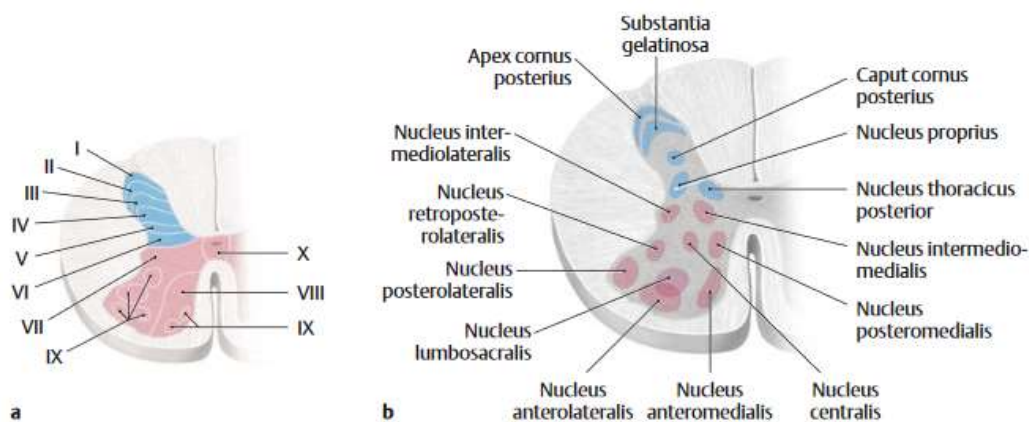


Abbildung 4. Schematischer Aufbau der grauen Substanz des Rückenmarks

a Laminae nach Rexed

b Zellgruppen in einem schematischen Querschnitt durch das Lumbalmark

(Abbildung aus Aumüller et al. 2014)

1.3 Endozytose

1.3.1 Endozytose

1.3.1.1 Funktion

Der Vorgang der Endozytose beschreibt die Aufnahme von extrazellulären Stoffen in die Zelle. Dies geschieht durch Einstülpungen in der Zellmembran, die die aufzunehmenden Stoffe einschließen und dadurch in die Zelle transportieren. Wie oben bereits beschrieben ist der Vorgang der Endozytose bei verschiedensten Prozessen von Bedeutung, zum Beispiel in der Zell-Zell-Kommunikation, der Immunantwort, dem Zellwachstum und der Zelldifferenzierung (Doherty und McMahon 2009; McMahon und Boucrot 2011; Parkar et al. 2009).

Es gibt verschiedene Formen der Endozytose. Zu den bekanntesten Formen zählen die Clathrin-vermittelte Endozytose, die Caveolae-abhängige Endozytose, die Phagozytose und die Macropinozytose (zur Übersicht über die verschiedenen Mechanismen der Endozytose siehe Doherty und McMahon 2009).

In neuronalem Gewebe ist die Endozytose von besonderer Wichtigkeit, da die per Exozytose ausgeschütteten Neurotransmitter wieder aus dem synaptischen Spalt entfernt werden müssen, um die Signalweiterleitung zu regulieren. Außerdem muss immer ein gewisser Pool an synaptischen Vesikeln zur Exozytose bereitstehen. Daher ist die synaptische Endozytose eng an die synaptische Exozytose geknüpft. Im zentralen Nervensystem gibt es mindestens drei Mechanismen zur Wiederaufnahme synaptischer Vesikel in die präsynaptische Terminale: die Clathrin-vermittelte Endozytose, die vor allem bei moderater neuronaler Stimulation aktiv ist, die aktivitätsabhängige Bulk-Endozytose (Clayton und Cousin 2009; Clayton, Evans, und Cousin 2008), bei der große Mengen an Neurotransmitter auf einmal wieder in die Zellen aufgenommen werden können und die vorwiegend während starker

neuronaler Aktivität aktiv wird, sowie eine kürzlich entdeckte ultraschnelle Form der Endozytose (Watanabe, Liu, et al. 2013; Watanabe, Rost, et al. 2013).

1.3.1.2 Clathrin-vermittelte Endozytose (clathrin-mediated endocytosis [CME])

In der Clathrin-vermittelten Endozytose werden extrazelluläre Stoffe an der Oberfläche der Zelle mithilfe von "Clathrin-coated" Vesikeln in das Zellinnere aufgenommen (Kirchhausen, Owen, und Harrison 2014). Es ist einer der Hauptwege, um synaptische Vesikel zu recyceln. (Cremona und De Camilli 1997). Die Clathrin-vermittelte Endozytose wird von allen bisher bekannten eukaryotischen Zellen verwendet. Die Vielseitigkeit der aufzunehmenden Stoffe kommt durch das Vorhandensein unterschiedlicher akzessorischer Adaptorproteine zustande bzw. durch die gezielte rezeptorvermittelte Aufnahme der Substanzen (McMahon und Boucrot 2011).

Zum Zwecke der Aufnahme wird ein ca. 3000 bis 5000 nm² großes Stück der Plasmamembran der Zelle zu einem Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 30 bis 40 nm geformt (Dittman und Ryan 2009). Der gesamte Prozess der Clathrin-abhängigen Endozytose kann in fünf Schritte eingeteilt werden: Initiation (nucleation), Auswahl des aufzunehmenden Stoffes (Cargo selection), Formung des Clathrin-Mantels (coat assembly), Abtrennung von der Plasmamembran (scission) und Wiederfreisetzung der beteiligten Proteine (uncoating).

Im ersten Schritt erfolgt die Bildung einer Membraninvagination (sogenannter "Pit"). Dazu organisieren sich an der Innenseite der Plasmamembran verschiedene an der Endozytose beteiligte Proteine aber auch Lipide z.B. Clathrin, AP2, Epsin und Phosphatidylinositole (Le Roy und Wrana 2005). Durch endozytotische Bindungsmotive in Rezeptoren (Ohno u. a. 1995) und Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat (PIP₂) in der Plasmamembran wird AP2 zur Plasmamembran rekrutiert (Höning u. a. 2005). PIP₂ wird dabei aktivitätsabhängig durch den Einfluss der Phosphatidylinositol-Kinase I γ in der Plasmamembran synthetisiert (Wenk et al. 2001). Diese Kinase rekrutiert während repetitiver Exozytose endozytotische

Faktoren und sorgt so für die Wiederaufnahme von synaptischen Vesikeln. Neuere Studien ergaben, dass bei der Initiation endozytotischer Vorgänge zunächst ein „Nukleationsmodul“ gebildet wird. Es entsteht aus verschiedenen Proteinen an der Stelle der Plasmamembran, an die Clathrin rekrutiert und Vesikel gebildet werden. Dieses Modul besteht aus "FCH domain only (FCHO)" Proteinen, "EGFR pathway substrate 15 (EPS15)" und Intersectin. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust eines der Proteine die Clathrin-Rekrutierung zur Zellmembran inhibiert (Stimpson et al. 2009; Henne et al. 2010). Die F-BAR Domäne von FCHO Proteinen kann schon bei leichten Krümmungen der Plasmamembran binden und seine Fähigkeit zur stärkeren Verformung der Plasmamembran ist notwendig für die weitere Entstehung der "Clathrin-coated pits" (Reider et al. 2009; Henne et al. 2010).

Das Nukleationsmodul rekrutiert AP2. AP2 wiederum, ein heterotetramerer Komplex, bindet auch Clathrin und koordiniert so den Zusammenbau von Clathrin und die "cargo selection" während der Endozytose (Keen 1987). Die aufzunehmenden Stoffe werden entweder von spezifischen Adaptorproteinen oder AP2 gebunden. Spezifische Adaptorproteine, wie z.B. Stonin 2, binden das Kernadaptorprotein AP2 (Schmid et al. 2006). In Abwesenheit von AP2 ist der Nukleationskomplex zwar versammelt, der Zusammenbau von Clathrin und die Vesikelformung finden allerdings größtenteils nicht statt (Boucrot u. a. 2010). FCHO Proteine haben ebenfalls eine mögliche Ligandenbindungsdomäne und können so in der Auswahl der zu endozytierenden Stoffe eine Rolle spielen (Henne et al. 2010; Reider et al. 2009). Des Weiteren können die aminoterminal Domäne von AP180 (ANTH) und die N-terminale Domäne von Epsin (ENTH) an die Plasmamembran binden und diese verformen. Außerdem haben sie eine Funktion in der "cargo selection" (Chidambaram, Zimmermann, und von Mollard 2008).

Sobald die aufzunehmenden Stoffe entweder an AP2 oder an spezifische Adaptorproteine gebunden sind, rekrutieren diese Clathrin-Triskelen an die zytosolische Seite der Zellmembran. Dort polymerisiert Clathrin zu einem polygonalen Netzwerk, um so bei der Formung der Vesikel zu assistieren. Da Clathrin allerdings an die flexible Region der Adaptorproteine AP2, AP180 und Epsin bindet, würde Clathrin alleine nicht ausreichen, um die Zellmembran adäquat zu deformieren, um die "coated pits" zu generieren. Stattdessen

sorgen Proteine wie FCHO Proteine, Epsin, Amphiphysin, SNX9 und Dynamin für eine ausreichende Krümmung und Destabilisation der Plasmamembran (McMahon und Boucrot 2011).

Zur Abschnürung von der Plasmamembran wird das mechanochemische Enzym Dynamin benötigt. Proteine mit BAR-Domänen halten sich vor allem am Hals des entstehenden Vesikels auf und helfen dabei den Hals zu formen. Dies wird auch durch eine erhöhte Aktin-Polymerisation in diesem Bereich unterstützt (Ferguson et al. 2009; Saffarian, Cocucci, und Kirchhausen 2009). Zu den BAR-Domänen-enthaltenden Proteinen gehören Amphiphysin, Endophilin und Sorting Nexin 9 (SNX9). Mit ihren SCR Homologie 3 Domänen (SH3) binden sie die Prolin-reiche Domäne Dynamins und rekrutieren so Dynamin zum Hals des Vesikels (Wigge et al. 1997; Ferguson et al. 2009; Sundborger et al. 2011). Bei der Dynaminpolymerisation um den Hals des Vesikels wird GTP hydrolysiert. Dadurch kommt es zur Konformationsänderung von Dynamin, die eine Einschnürung oder eine Dehnung der Plasmamembran zur Folge hat. Dies wiederum führt zur Abschnürung der Vesikel (Sweitzer und Hinshaw 1998; Ferguson und De Camilli 2012).

Nach dem Abschnüren der Vesikel von der Plasmamembran wird der Clathrin-Korb mithilfe von Auxilin, der Cyclin G-assoziierten Kinase (GAK) und HSC70 (Hitzeschockprotein 70; heat shock cognate 70) freigesetzt (Ungewickell et al. 1995; Schlossman et al. 1984). Auxilin wird nach der Vesikelknospung rekrutiert, in dem es an die terminalen Domänen der Clathrin-Triskele bindet. Dann rekrutiert Auxilin das Protein HSC70 (Fotin et al. 2004). Das Vesikel durchläuft anschließend verschiedene Signalwege, bevor es entweder zu seinem Bestimmungsort in der Zelle gelangt und dort durch Fusion mit dem intrazellulären Kompartiment seinen Inhalt ausschüttet oder zurück an die Oberfläche gelangt und mittels Exozytose in die extrazelluläre Umgebung freigesetzt wird (Doherty und McMahon 2009). Die an der Endozytose beteiligten zytoplasmatischen Proteine werden wieder ins Zytoplasma freigesetzt und warten dort auf den nächsten Endozytosezyklus, in dem sie wieder ihren Einsatz finden.

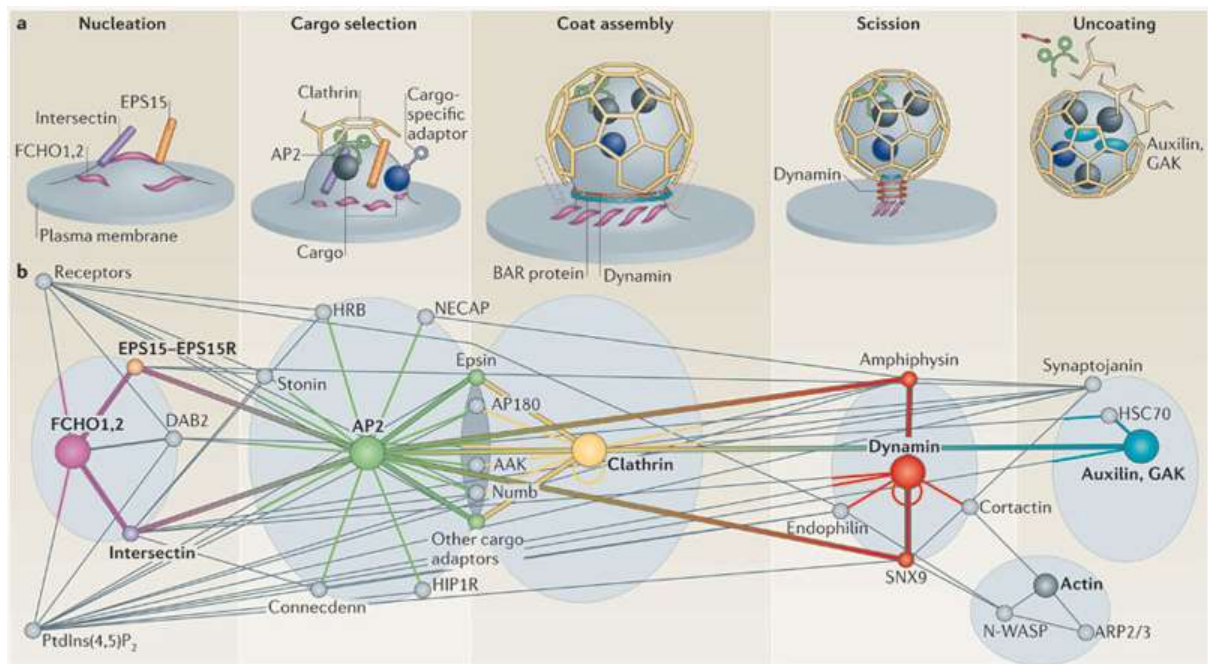


Abbildung 5. Ablauf der Clathrin-abhängigen Endozytose

a Dargestellt sind die fünf Schritte der Clathrin-abhängigen Endozytose. **Nucleation**: FCHO (FCH domain only)-Proteine binden Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) in der Plasmamembran und rekrutieren EPS15-EPSP-15R (EGFR pathway substrate 15- EPSP-related) und Intersectine zur Initiation eines Clathrin-ummantelten "Pits". Dies geschieht mithilfe der Rekrutierung von AP2. **Cargo selection**: AP2 bindet verschiedene Rezeptoren direkt mit seinen μ - oder σ -Untereinheiten. Verschiedene spezifische Adaptorproteine wie Stonin binden AP2 und rekrutieren spezifische Rezeptoren. **Coat assembly**: Clathrin-Triskele werden durch AP2 rekrutiert und bilden Hexagone und Pentagone zur Formung des Clathrin-Mantels um den sich bildenden Pit. **Scission**: die GTPase Dynamin wird durch BAR-Domänen-enthaltende Proteine zum Hals des sich bildenden Vesikels mobilisiert. Dort polymerisiert es spontan und induziert nach Hydrolyse von GTP die Abschnürung des Vesikels von der Plasmamembran. **Uncoating**: Auxilin oder die Cyclin G-assoziierte Kinase (GAK) rekrutieren das Hitzeschockprotein 70 (HSC70). Mithilfe dieser Proteine wird der Clathrin-Mantel wieder freigesetzt.

b Clathrin-Netzwerk: dargestellt sind die Protein-Protein-Interaktionen während der verschiedenen Stationen der Endozytose

(McMahon und Boucrot 2011)

1.3.1.3 Aktivitätsabhängige Bulk-Endozytose (activity-dependent bulk endocytosis [ADBE])

Während die Clathrin-vermittelte Endozytose vor allem für die Wiederaufnahme synaptischer Vesikel während mäßiger Neurotransmitterausschüttung verantwortlich ist

(Zhu, Xu, und Heinemann 2009), wird die aktivitätsabhängige Bulk-Endozytose zusätzlich zur Clathrin-abhängigen Endozytose bei massiver synaptischer Transmission aktiv (Royle und Lagnado 2003; Clayton, Evans, und Cousin 2008).

Die genauen molekularen Mechanismen sind noch nicht im Detail verstanden (Clayton und Cousin 2009). Charakteristisch sind allerdings die großen Plasmamembraneinstülpungen, die sich dann zu einem Endosomen-ähnlichen Kompartiment formen (Recyclosomen). Aus diesen Kompartimenten können zahlreiche synaptische Vesikel ausknospen und den Pool intrazellulärer synaptischer Vesikel rasch wieder auffüllen (Clayton und Cousin 2009). Während starker neuronaler Stimulation steigt der Calciuminflux in die Zelle. Die Calcium- und Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin registriert diese Zunahme und dephosphoryliert die Proteingruppe der Dephosphine. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem Dynamin 1, Amphiphysin 1 und 2, Synaptojanin, Epsin, EPS15 und AP180 (Cousin und Robinson 2001). Durch Inhibition von Dynamin 1 mit Dynasore, einem spezifischen Inhibitor von Dynamin (Macia et al. 2006; Preta, Cronin, und Sheldon 2015) und des daraus resultierenden Sistieren der endozytotischen Aktivität, konnte gezeigt werden, dass Dynamin 1 essentiell für die ADBE ist (Clayton et al. 2009). Im dephosphorylierten Zustand ist Dynamin in der Lage mit Syndapin zu interagieren. Diese Interaktion ist notwendig für die ABDE. Die Interaktion Dynamins mit Amphiphysin, die in der Clathrin-abhängigen Endozytose benötigt wird, ist allerdings vom Phosphorylierungsstatus Dynamins unabhängig. Somit ist der Phosphorylierungszustand Dynamins für die Clathrin-abhängige Endozytose im Gegensatz zur ADBE nicht entscheidend (Tan et al. 2003; Graham et al. 2007; Clayton und Cousin 2009; Clayton et al. 2009; Anggono et al. 2006). Dies ist ein Erklärungsansatz für die Unabhängigkeit der Clathrin-abhängigen Endozytose von der neuronalen Aktivität.

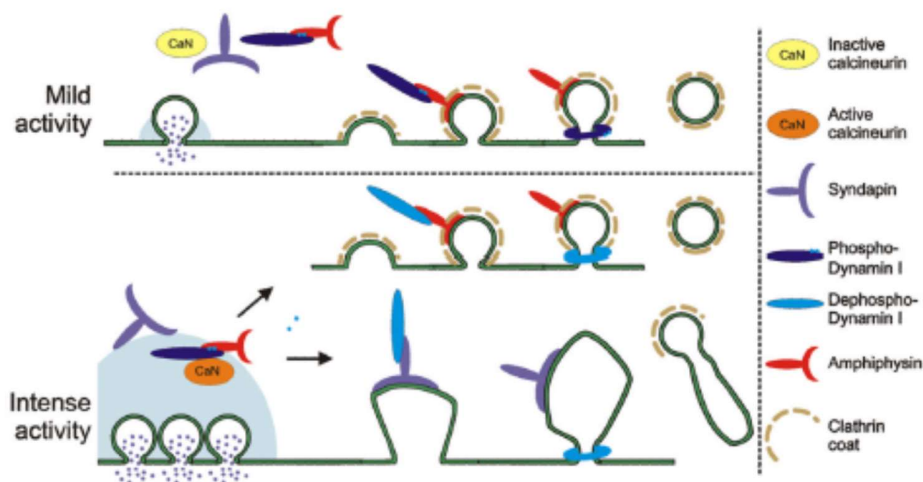


Abbildung 6. Aktivitätsabhängige Endozytose synaptischer Vesikel

Während moderater nervaler Stimulation (mild activity) liegt Dynamin1 phosphoryliert vor und der Weg der Clathrin-abhängigen Endozytose wird eingeschlagen.

Bei starker neuronaler Aktivität (intense activity) hingegen dephosphoryliert Calcineurin Dynamin 1. Dieses kann nun von Amphiphysin gebunden werden und die synaptischen Vesikel werden internalisiert oder das dephosphorylierte Dynamin 1 wird von Syndapin gebunden. Dann wird die ABDE aktiv und im Weiteren schnürt Dynamin 1 die Endosomen ab. Im letzten Schritt sortieren Clathrin-Adaptorproteine dann die aufzunehmenden Stoffe und Clathrin polymerisiert zu einem Mantel an den Endosomen (Takei et al. 1996; Andersson et al. 2008).

(Abbildung aus Clayton und Cousin 2009)

1.3.2 Dynamin

Dynamin ist ein 100-kDa großes, zytosolisches Protein aus der Familien der Dynamin-ähnlichen GTPasen (Guanosintriphosphatasen). Diese Proteine unterliegen extensiven Splicevorgängen. Man spekuliert, dass diese Splicevorgänge zur Erfüllung der unterschiedlichen Aufgaben von Dynamin an den verschiedenen Stellen in der Zelle wichtig sind (McNiven et al. 2000). Sehr viele Details in diesen Vorgängen sind bisher noch ungeklärt und so seit der Entdeckung Dynamins vor über 20 Jahren Teil der aktuellen Forschung (Ferguson und De Camilli 2012; Schmid und Frolov 2011).

Dynamin ist an verschiedenen Formen der Endozytose beteiligt. Die am besten erforschte Form ist die Clathrin-abhängige Endozytose, in der Dynamin am Abschnürungsprozess der Vesikel von der Plasmamembran beteiligt ist. Dynamin spielt aber auch bei anderen Formen der Endozytose eine Rolle, wie zum Beispiel bei der Caveolae-abhängigen Endozytose (Mayor und Pagano 2007; Henley et al. 1998), bei der Phagozytose (Gold et al. 1999), bei der Aufnahme von IL2R β (Lamaze et al. 2001) oder bei der Bildung von "circular dorsal ruffles" (Krueger et al. 2003). Es gibt allerdings auch Dynamin-unabhängige Formen der Endozytose (Doherty und McMahon 2009).

Darüber hinaus besitzt Dynamin noch Aufgaben bei der Bildung von Endosomen im trans-Golgi-Netzwerk (Jones et al. 1998; Henley und McNiven 1996; McMahon und Boucrot 2011; Yang et al. 2006; Praefcke und McMahon 2004) und bei der Sortierung von Toxinen in intrazellulären Membrankompartimenten (Llorente et al. 1998; Cao, Garcia, und McNiven 1998). Außerdem interagiert Dynamin sowohl direkt und als auch indirekt mit dem Zytoskelett. Es ist vor allem im Aktinnetzwerk eingebunden (Ferguson und De Camilli 2012).

Im Genom von Säugetieren sind bisher drei Gene bekannt, die für Dynamin kodieren (*DNM1*, *DNM2*, *DNM3*) (Cao, Garcia, und McNiven 1998). Die aus diesen Genen hervorgehenden drei Isoformen Dynamins besitzen alle dieselbe Organisation ihrer Domänen und sind zu 80% homolog in ihrer Proteinstruktur. Allerdings besitzen sie unterschiedliche Expressionsmuster. Dynamin 1 ist im neuronalem Gewebe exprimiert (Ferguson et al. 2007). Dynamin 2 kommt ubiquitär vor (Cook, Urrutia, und McNiven 1994) und besitzt "housekeeping" Funktionen in der Zelle (Ferguson et al. 2009). Dynamin 3 wird vor allem im Gehirn exprimiert, allerdings in viel geringeren Konzentrationen als Dynamin 1. Daneben ist Dynamin 3 auch im Hoden oder in der Lunge nachgewiesen worden (Cao, Garcia, und McNiven 1998; Ferguson et al. 2007; Raimondi et al. 2011). Aufgrund multipler Splicevarianten, die es von allem drei Dynaminoisformen gibt, kommt es zu der großen Diversität der Dynaminproteine (Cao, Garcia, und McNiven 1998).

Das Grundgerüst der Dynamin-Proteine besteht aus einer N-terminalen GTPase- oder G-Domäne, einer α -helikalen Mittel- oder Stielregion, einer Pleckstrin Homologie (PH) Domäne, einer GED (GTPase effector domain) und einer Prolin-reichen C-terminalen Region

(proline-rich domain; PRD). Die G-Domäne enthält die GTPase-Funktion Dynamins. Hier findet der Zyklus von Guanosintriphosphat-Beladung und -Hydrolyse statt (Ferguson und De Camilli 2012). Die Stielregionen von zwei Dynaminmonomeren polymerisieren über Kreuz und werden zu einem Dynamin-Dimer, der funktionellen Dynamin-Basiseinheit. Dabei weisen die beiden G-Domänen in gegensätzliche Richtungen (Faelber et al. 2011). Die PH-Domäne bildet den Fuß des Dynaminproteins. Sie beinhaltet eine positiv geladene Haarnadelstruktur. Über diese Struktur bindet Dynamin negativ geladene Plasmamembranphospholipide wie Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat (Zheng et al. 1996). Die PRD-Domäne besitzt eine Ansammlung von PxxP Aminosäuren-Motiven, die die Proteininteraktionen mit SRC Homologie 3 (SH3) Domänen-enthaltenden Bindungspartnern während der Endozytose vermitteln (Anggono et al. 2006; Anggono und Robinson 2007; Grabs et al. 1997; Lundmark und Carlsson 2004; Shpetner, Herskovits, und Vallee 1996).

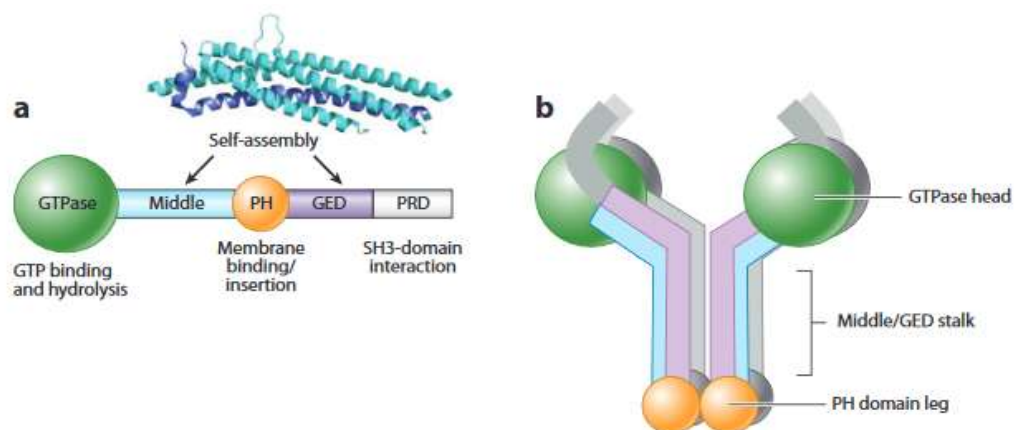


Abbildung 7. Struktur und Organisation von Dynamin

- a** Aufteilung Dynamins in verschiedene Domänen: G-Domäne, Mittel-Domäne, PH-Domäne, GED-Domäne und PRD-Domäne. Ihre Funktionen sind im Text beschrieben
b Tetramere Struktur Dynamins in Lösung

(Abbildung aus S. L. Schmid and Frolov 2011)

Aufgereinigtes Dynamin liegt als Tetramer vor (Muhlberg, Warnock, und Schmid 1997; Ramachandran et al. 2007) und polymerisiert spontan in Lösungen mit niedriger Ionenstärke zu Ringen oder Helices (Hinshaw und Schmid 1995).

Die Funktion Dynamins bei der Clathrin-abhängigen Endozytose wurde bereits in Kapitel 1.3.1.2 beschrieben.

Dynamin 1 ist in hohen Konzentrationen im Nervensystem präsent. Dort ist es vor allem in den Synapsen konzentriert. Während der Synaptogenese steigt seine Konzentration messbar an (Ferguson et al. 2007; Nakata et al. 1991). Dynamin 1 galt lange als essentiell für die synaptische Vesikel-Endozytose (Clayton et al. 2009; Newton, Kirchhausen, und Murthy 2006; Xue et al. 2011), aber entbehrlich für Basisfunktionen im Nervensystem (Ferguson et al. 2007). Allerdings zeigten Studien an Dynamin 1 und 3 Knock-out-Mäusen, dass ein Teil der Vesikelwiederverwertung durch die Überexpression von Dynamin 2 aufgefangen werden kann, wobei die Beteiligung von Dynamin-unabhängigen Endozytosewegen nicht beurteilt wurde (Ferguson und De Camilli 2012). Dynamin 1 und andere endozytotische Proteine, zusammenfassend als Dephosphine bezeichnet, liegen in ruhenden Synapsen konstitutiv in phosphorylierter Form vor. Für einen Teil der Phosphorylierung ist Cdk5 verantwortlich (Tan et al. 2003; Smillie und Cousin 2005; Tomizawa et al. 2003). Während nervaler Stimulation und darauffolgender synaptischer Vesikel-Endozytose wird Dynamin rasch von der Calcium- und Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert (Cousin und Robinson 2001). In diesem Zustand kann Dynamin 1 mit Syndapin interagieren (Anggono et al. 2006; Clayton und Cousin 2009). Eine spezielle Splicevariante von Dynamin 1 (Dynamin 1xb), gegen die sich auch der zentrale Antikörper dieser Doktorarbeit richtet, ist in der Lage über ein PxlIT-ähnliches Bindungsmotiv (PRITIS) direkt mit Calcineurin zu interagieren (Xue et al. 2011; Bodmer, Ascaño, und Kuruvilla 2011; Ferguson und De Camilli 2012). Die Dephosphorylierung durch Calcineurin scheint der primäre Triggermechanismus für die aktivitätsabhängige Bulk-Endozytose von synaptischen Vesikeln (activity-dependent bulk endocytosis [ADBE]) zu sein (Clayton et al. 2010, 2009; Xue et al. 2011).

Die Funktionen Dynamins in der aktivitätsabhängigen Bulk-Endozytose sind bereits in Kapitel 1.3.1.3 beschrieben.

Mutationen in den Dynamingenen stehen im Zusammenhang mit bestimmten Krankheiten. Eine Mutation im DNM1-Gen als Auslöser einer Krankheit im Menschen konnte noch nicht

identifiziert werden. Allerdings kann eine Dysfunktionalität von Dynamin 1, aufgrund seiner Funktionen in der Wiederaufnahme von synaptischen Vesikel auch während starker neuronaler Aktivität, ein Erklärungsansatz für den Exercise Induced Collapse (EIC) bei Labrador Retrievern sein (Patterson et al. 2008; Heymann und Hinshaw 2009). Auch konnte gezeigt werden, dass die Dynamin-1-Level im Gehirn von Alzheimer-Patienten erniedrigt sind (Yao et al. 2003). Gegenwärtig wird außerdem eine Rolle Dynamin 1 in der Entstehung von Epilepsie diskutiert (Ferguson und De Camilli 2012). Für Dynamin 2 hingegen konnte im Menschen schon der Zusammenhang zwischen Mutationen im *DNM2*-Gen und der Entstehung der Charcot-Marie-Tooth Typ B Krankheit (Züchner et al. 2005; Claeys et al. 2009) und der zentronukleären Myopathie (Catteruccia et al. 2013; Bitoun et al. 2005) gezeigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

2.1.1.1 Primärantikörper

Anti-Dynamin 1xb Antikörper (Klon 1E10): Der monoklonale Antikörper (Klon 1E10) richtet sich gegen das Peptid CPPGVPRITISDP in der Calcineurinbindungsdomäne der Splicevariante Dynamin 1xb. Diese Dynaminform kann direkt an die Phosphatase Calcineurin binden. Die Interaktion erfolgt über ein PxlIT-ähnliches Bindungsmotiv für Calcineurin (PRITIS) (Ferguson und De Camilli 2012; Bodmer, Ascaño, und Kuruvilla 2011; Xue et al. 2011). Das korrespondierende Blockierungspeptid stammt von der Firma Scilight peptide. Der Dynaminantikörper wurde in Immunfluoreszenzfärbungen 1:300 und in Western Blot Experimenten 1:1000 verdünnt.

Anti-RIBEYE (B)-Domäne/CtBP2 Antikörper (U2656, Schmitz, Königstorfer, and Südhof 2000): Es handelt sich um ein Kaninchen Antiserum gegen die RIBEYE(B)-Domäne. Der Antikörper wurde in Immunfluoreszenz Färbungen 1:1000 verdünnt.

Anti-panSV2Antikörper: Bei diesem Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper gegen das synaptische Vesikelprotein SV2 (gegen alle Varianten von SV2; Buckley und Kelly 1985). Hierbei handelt es sich um den Überstand von kultivierten Hybridoma-Zellen. Diese stammen aus der Hybridoma Bank der Universität von Iowa

(Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB). Der Zellüberstand wurde in einer Verdünnung von 1:50 in Immunfluoreszenzfärbungen verwendet.

Anti-Synaptotagmin 1 Antikörper (V216, (Perin et al. 1990; Pang et al. 2006; Bacaj et al. 2015): Es handelt sich um ein Kaninchen Antiserum gegen Synaptotagmin 1, das Calcium-Sensorprotein in der Membran synaptischer Vesikel. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:250 genutzt.

Anti-RIM 1/2 Antikörper (Wahl et al. 2016; Anjum, Ayoubian, und Schmitz 2014; Schoch et al. 2006): Es handelt sich um einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper. RIM reguliert präsynaptisch in der aktiven Zone die Ca^{2+} -getriggerte Neurotransmitterausschüttung. Die verwendete Verdünnung in den Immunfluoreszenzfärbungen betrug 1:250.

Anti-Aktin C4 Antikörper (Millipore, Cat #MAB1501(Noack et al. 2012; Sauls et al. 2015)): Es handelt sich um einen monoklonalen Mausantikörper. Aktin ist ein zytoskeletales Protein, das in allen Zellen vorhanden ist. Der Antikörper wurde in Western Blot Experimenten in einer Verdünnung von 1:5000 als Ladungskontrolle verwendet.

Fab Anti-Maus IgG Fragment (Kaninchen) (Rockland, Code: 810-4102): Es handelt sich um einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper-Fragment. Er richtet sich gegen das gesamte Maus-IgG-Molekül. Der Antikörper wurde in Immunfluoreszenzexperimenten in einer Verdünnung von 1:50 genutzt.

Anti- β Tubulin (Santa Cruz Biotechnology (H-235): sc-9104, (Gimigliano et al. 2012)): es handelt sich um einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper. Er wurde in Immunfluoreszenzexperimenten in einer Verdünnung von 1:150 eingesetzt.

2.1.1.2 Synthetische Peptide

Die Peptide für die Dotblotexperimente wurden von der Firma Proteogenix (Illkirch, Frankreich) und der Firma Scilight Biotechnology LLC (Peking, China) synthetisiert. Folgende Peptide wurden synthetisiert: 1.) PPGVPRITISDP (12mer; PP12); 2.) PPGVP (5mer; PP5) and 3.) RITISDP (7mer; RP7).

2.1.1.3 Sekundärantikörper

In den Immunfluoreszenzexperimenten wurden folgende fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper eingesetzt: Huhn Anti-Maus Alexa488; Esel Anti-Kaninchen Alexa568, Esel Anti-Maus Alexa568 und Huhn Anti-Kaninchen Alex488. Diese Antikörper stammen von Molecular Probes/Invitrogen. Sie wurden in einer 1:1000 Verdünnung für eine Stunde bei Raumtemperatur eingesetzt. Des Weiteren wurde zur Markierung der Zellkerne in der Immunfluoreszenzfärbung DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) in einer Verdünnung von 1:1000 genutzt. DAPI wurde auf den Schnitten ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur gemeinsam mit den Sekundärantikörpern inkubiert.

In den Western Blot Experimenten wurde folgender mit Meerrettich-Peroxidase konjugierter Sekundärantikörper von (Sigma Aldrich) eingesetzt: Anti-Maus (IgG) in einer Verdünnung von 1:10.000.

2.1.2 Gewebe

Alle Experimente wurden mit C57Bl/6J Mäusen beider Geschlechter durchgeführt. Die Tierhaltung und experimentellen Prozeduren wurden gemäß den Richtlinien des tierethischen Komitees der Universität des Saarlandes durchgeführt. Die Mäuse wurden bei Standard Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und am frühen Nachmittag getötet. Die Augen wurden zuerst bei Tageslicht (Luminanz von $\approx 2 \text{ cd/m}^2$) entnommen. Danach folgte die Entnahme von Cerebellum, Neocortex, Rückenmark, Nieren und Darm.

2.1.3 Einbettmedium

Als Einbettmedium wurde Epon Harz verwendet. Dazu wurden 13g 812 Epon, 5,5g DDSA (Dodeceny Succinic Anhydride), 8g MNA (Methyl-5-Norbornene-2,3-Dicarboxylic Anhydride) und 0,2g DMP 30 Epoxy Accelator (2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol) mit einer Pasteur-Einmal-Pipette sorgfältig gemischt und danach entgast.

2.2 Methoden

2.2.1 Immunfluoreszenzmikroskopie

2.2.1.1 Harz-Einbettung für 0,5µm dünne Schnitte (Semidünnschnitte)

Die Methode zur Gewebeeinbettung ist eine Abwandlung der von Drenckhahn und Franz beschriebenen Prozedur (Drenckhahn und Franz 1986) und wurde, wie in Wahl et al. (2013) beschrieben, durchgeführt.

Zuerst wurde das entnommene Maus-Gewebe in in Stickstoff gekühltem Isopentan schockgefroren. Anschließend erfolgte die Gefriertrocknung (Lyophilisation) bei konstanter Gewebekühlung mit Hilfe von flüssigem Stickstoff (Abwandlung zur Original-Methode) für ca. 24 Stunden, wie von der AG Schmitz beschrieben (Wahl et al., 2013, 2016; Dembla et al., 2014). Das Vorvakuum wurde durch eine Öl-Diffusionspumpe (Typ DUO 004B; Arthur-Pfeiffer-Vakuumtechnik, Wetzlar/Aßlar) erzielt. Das für die Lyophilisation notwendige Vakuum von ca. 10^{-7} mbar wurde dann durch eine TCP270 Turbomolekular- Pumpe (Arthur-Pfeiffer-Vakuumtechnik, Wetzlar/Aßlar) erzeugt. Kontrolliert wurde das Vakuum durch ein PKG020 Pirani-Gold-Kathodenmanometer. Anschließend wurde das Gewebe weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur und immer noch vorhandenem Vakuum an der Vakuumpumpe inkubiert. Nach erfolgter Lyophilisation wurden die Proben bei Raumtemperatur mit Epon Harz infiltriert. Zur kompletten Infiltration wurden die Proben in Epon Harz bei 27 °C auf ein Drehrad für 24 Stunden gegeben. Die Proben wurden in Förmchen umgebettet. Die Aushärtung des Harzes erfolgte anschließend bei 60°C für 24 Stunden.

2.2.1.2 Immunfluoreszenzmarkierung von Semidünnschnitten

Von den wie oben beschrieben eingebetteten Gewebestücken wurden 0,5µm dünne Schnitte mit einem Reichert Ultramikrotom angefertigt.

Um das Epon Harz aus dem Gewebe herauszulösen wurde die von Major et al. beschriebene Methode mit leichten Veränderungen genutzt (Mayor, Hampton, and Rosario 1961). Die Schnitte wurden zuerst 15 min mit Natriummethylat inkubiert (30% Lösung in Methanol; MERCK). Anschließend erfolgte eine ebenfalls 15-minütige Inkubation in einer Mischung von Xylol und Methanol zu jeweils gleichen Anteilen. Danach wurden die Schnitte zweimal für jeweils 10 min in Aceton inkubiert. Gewaschen wurden die Schnitte zuerst mehrfach mit H₂O für 10 min, gefolgt von mehrmaligem Waschen mit PBS ebenfalls insgesamt für 10 min.

Nun wurden die Schnitte zuerst über Nacht bei 4°C mit den jeweiligen Primärantikörpern inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS für 3 x 5 min am nächsten Tag wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut gewaschen (3 x 5 min mit PBS). Zum Mikroskopieren wurden die Deckgläser mit den Gewebeschnitten mit Hilfe eines Einbettmediums, welches Ausbleichen verhindert (NPG; N-Propylgallat in 10% Glycerin) auf einen Objektträger aufgebracht. Die so aufgebrachten Deckgläser wurden anschließend mit Nagellack umrandet, um einerseits das Verrutschen der Deckgläser und andererseits das Austrocknen der Gewebeschnitte zu verhindern (Schmitz, Königstorfer, und Südhof 2000).

Die Abwandlung dieser Markierungsmethode mit dem Einsatz zweier monoklonaler Antikörpern wurde wie im Folgenden beschrieben durchgeführt. Die zugrunde liegende Methode wurde von Lewis Carl, Gillete-Ferguson, und Ferguson (1993) beschrieben. Nach Inkubation mit dem ersten monoklonalen Primärantikörper über Nacht und anschließendem Waschen wurden die Schnitte mit dem ersten Sekundärantikörper (hier wurde Huhn Anti-Maus Alexa488 verwendet) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte wieder mit PBS gewaschen und für 3 Stunden ebenfalls bei Raumtemperatur mit Fab Anti-Maus IgG inkubiert, um die Bindungsstellen für den Sekundärantikörper abzusättigen. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C mit dem zweiten monoklonalen Primärantikörper inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit PBS am nächsten Tag folgte die Inkubation mit dem zweiten Sekundärantikörper (hier wurde Esel Anti-Maus Alexa568 verwendet) für eine Stunde bei

Raumtemperatur. Anschließend wurde weiter verfahren wie oben beschrieben. Die Schnitte wurden erneut gewaschen, mit NPG auf einen Objektträger gegeben und auf diesem fixiert.

2.2.1.3 Kontrollinkubationen

Bei den Kontrollinkubationsexperimenten wurde statt des Primärantikörpers mit PBS inkubiert. Dann wurde wie oben beschrieben weiter mit der Inkubation des Sekundärantikörpers fortgefahren. Es wurden nur unspezifische Strukturen wie Gefäße oder Hirnhäute und Hintergrund sichtbar.

Weitere Kontrollexperimente waren Präabsorptionsexperimente. Dieses Prozedere wird weiter unten beschrieben.

2.2.1.4 Präabsorptionsexperimente

Hierfür wurden die Antikörperserien von Dynamin 1xb (Klon 1E10) zu ihren geeigneten Arbeitslösungen 1:300 verdünnt. Dann wurden entweder 20µg des spezifischen Peptids, gegen welches der Antikörper generiert wurde (CPPGVPRITISDP), oder die gleiche Menge eines irrelevanten Peptids (exemplarisch in dieser Doktorarbeit wurde ein Clathrinpeptid verwendet) zu den verdünnten Antikörpern gegeben. Die Lösungen wurden dann über Nacht bei 4°C über Kopf-rotierend inkubiert und am folgenden Tag für Immunmarkierungsexperimente genutzt. Hierzu wurde ebenso verfahren wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben (Wahl, Katiyar, und Schmitz 2013).

2.2.1.5 Konfokalmikroskopie

Die in Immunfluoreszenzexperimenten immungefärbten Semidünnschnitte wurden mit Hilfe des Konfokalmikroskop A1R der Firma Nikon beurteilt. Es wurde ein 60x Öl-Immersion-Objektiv (Plan Apo VC, Firma Nikon, numerische Apertur: 1,4) verwendet. Die Immunfluoreszenzsignale im Grün-Kanal wurden mit einem blauen Festkörperlaser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm angeregt. Die entsprechende Emissionsdetektion

lag zwischen 500-550nm. Die Anregungswellenlänge für den roten Kanal betrug 568 nm (grüner Festkörperlaser) mit einer Emissionsdetektion von 570-620 nm. Es wurde kein Durchschlagen der Signale in andere Kanäle beobachtet. Immunfluoreszenzfärbungen und Kontrollexperimente wurden unter den gleichen Bedingungen (gleiche Laserpower, gleicher Offset, gleicher Kontrast, gleiche Gamma-Werte) aufgenommen. Dies wurde erzielt, indem die Funktion „reuse camera settings“ der NIS elements software verwendet wurde (Wahl et al. 2016). Die Dokumentation durch den Laser angeregter Fluoreszenzsignale erfolgte ebenfalls mit der NIS elements software.

2.2.1.6 Epifluoreszenzmikroskopie

Zur ergänzenden Dokumentation der immungefärbten Semidünnschnitte wurde wie zuvor beschrieben Wahl et al. (2016) das Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 200M der Firma Zeiss genutzt. Bei der Lichtquelle handelt es sich um den Oligochrom der Firma Till Photomics. Es wurde für alle Bilder ein 40x Öl-Immersion-Objektiv (Plan Neofluar, Firma Zeiss, numerische Apertur: 1,3) verwendet. Die mit DAPI gefärbten Zellkerne stellten sich dabei durch Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 395-440 nm dar (Anregungsfilter). Ein im Strahlengang eingebauter Strahlenteiler teilte das Licht bei einer Wellenlänge von 460 nm. Licht ab einer Wellenlänge von 470 nm wurde mit Hilfe eines Detektionsfilters registriert. Die Anregung im Grün-Kanal erfolgte bei einer Wellenlänge von 450-490 nm (Anregungsfilter). Hier befand sich der Strahlenteiler bei 510 nm und die wahrgenommene Emission lag bei 515-565 nm (Emissionsfilter). Im Rot-Kanal wurde bei einer Wellenlänge von 540-552 nm (Anregungsfilter) angeregt. Der im Strahlengang eingebaute Strahlenteiler ließ alle Strahlung mit einer Wellenlänge größer als 580 nm zum Emissionsfilter (590 nm) und der nachgeschalteten Kamera durch. Die verwendete Software zur Dokumentation der im Mikroskop gesehenen Fluoreszenzsignale war AxioVision release 4.8 von Zeiss. Es wurde kein Durchschlagen der Signale in andere Kanäle beobachtet. Immunfluoreszenzfärbungen und Kontrollexperimente wurden unter den gleichen Bedingungen (gleiche Expositionszeit, gleiche Vergrößerung, gleiche Gamma-Werte und gleiche Rahmengröße der Kamera) aufgenommen.

2.2.2. SDS-PAGE und Western Blot

2.2.2.1 Proteinbestimmung mit Amidoschwarz

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der Proben für die SDS-PAGE und Western Blot Experimente wurde die Amidoschwarzbestimmungsmethode von (Dieckmann-Schuppert und Schnittler 1997) herangezogen. Die ursprüngliche Methode stammt von Heinzel et al. (1965). Vorteil dieser Methode ist, dass der Proteingehalt unabhängig vom verwendeten Puffer bestimmt werden kann und diese Methode auch bei Anwesenheit von Detergenzien sehr robust und genau funktioniert.

Die zu analysierenden Proteinproben des entnommenen Gewebes wurden wie folgt hergestellt: das entnommene Mausgewebe wurde in Lysispuffer gegeben und mit einem Sonifikator mittels Ultraschall homogenisiert.

Es wurden BSA-Standards mit definiertem Proteingehalt (80/ 40/ 20/ 10/ 5/ 2,5/ 1,25 µg Protein pro 10 µl Lysispuffer) hergestellt. Jeweils 10 µl dieser Standards und der hergestellten Proteinproben sowie des als Leerwert dienenden Lysispuffers wurden auf 1cm² große Felder aus Zelluloseacetatfolie gegeben und trocknen gelassen. Anschließend wurden die Folienstücke mit der Amidoschwarz-Färbelösung für 10 min gefärbt. Danach wurden die gefärbten Folienstücke in 2µl Eppendorfreaktionsgefäße gegeben und mit Entfärbelösung mehrmals gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Folie getrocknet und mit Auflöselösung aufgelöst. Die so erhaltenen Lösungen wurden im Photometer bei 620 nm gemessen. Mit den Standards und deren Absorption wurde eine Eichkurve erstellt und der Proteingehalt der Proben für die SDS-Page und Western Blot Experimente bestimmt.

Färbelösung	0,5% Amidoschwarz 45% Methanol 45% H ₂ O destilliert 10% Eisessig
-------------	---

Entfärbelösung	47,5% Methanol 47,5% H ₂ O destilliert 5 % Eisessig
Auflöselösung	80% Ameisensäure 10% Eisessig 10% Trichloressigsäure

2.2.2.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde, wie von Schmitz et al. (2000); und Johnston et al. (1989) beschrieben, durchgeführt.

Die Proben wurden wie unter 2.2.2.1 beschrieben vorbereitet. Vor dem Einsatz in den SDS-PAGE-Experimenten wurden diese in SDS-Ladungspuffer (Stock: 4 x) bei 96°C für ca. 10 min aufgeköcht.

Zur eindimensionalen Gelelektrophorese wurde ein zehnprozentiges Trenngel hergestellt. Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten in eine Amersham-Gelgießvorrichtung gefüllt und auspolymerisieren lassen. Danach wurde das Sammelgel (3%) hergestellt und auf das Trenngel gegossen. Um ein Auftragen der Proben zu ermöglichen, wurde ein entsprechender Kamm in das noch nicht auspolymerisierte Sammelgel gesteckt.

Nach Auspolymerisation des Sammelgels wurde das fertige Gel aus der Gelgießapparatur in die Elektrophoresekammer überführt. Dann wurden entsprechende Proteinproben und der Marker für die Molekulargewichtsstandards in die Taschen des Sammelgels gefüllt. Anschließend wurden Proteine entsprechend ihrer molekularen Größen bei 100V für ca. 3 Stunden getrennt. Während des Trennvorgangs war das SDS-PAGE-Gel von SDS-PAGE-Elektrophoresepuffer umgeben.

SDS-Ladungspuffer 4 x	1,6g SDS 4ml β -Mercaptoethanol 2ml Glycerol 2ml 1 M Tris pH 7 4mg Bromphenol Blau 2ml destilliertes Wasser
Trenngel	1,5 ml H ₂ O 1,9 ml 1 M Tris pH 8,8 2,5 ml 30% Acrylamid 75 μ l 10% SDS 1,5 ml 50% Glycerol 5 μ l TEMED 38 μ l 10% APS
Sammelgel	4,73 ml H ₂ O 1,88 ml 0,5 M Tris pH 8,8 0,75 ml 30% Acrylamid 75 μ l 10% SDS 7,5 μ l TEMED 56,3 μ l 10% APS

Elektrophoresepuffer	3,03g Tris 14,4g Glycin 1,0g SDS Aufgefüllt mit destilliertem Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 1 Liter
----------------------	---

2.2.2.3 Western Blot

Die Western Blot Experimente wurden durchgeführt wie von Schmitz et al. (2000) beschrieben.

Aus dem SDS-PAGE-Gel wurden die aufgetrennten Proteine in einer Blotkammer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und immobilisiert. Dieser Vorgang erfolgte für 5 Stunden bei 50V und 4°C Umgebungstemperatur. Umgeben war die Membran während des Blotvorgangs mit Transferpuffer.

Anschließend wurde die Membran mit Ponceau S-Färbelösung reversibel gefärbt, um die Proteinbeladung und den Marker/Größenstandard sichtbar zu machen. Nachfolgend wurde mit 5 x PBS entfärbt und unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 5% Magermilch für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert.

Dann erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Primärantikörpern über Nacht bei 4°C. Die Primärantikörpersignale wurden durch mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Sekundärantikörper und nachfolgender "enhanced chemoluminescence (ECL)" sichtbar gemacht. Die ECL-Signale wurden mit einem Bio-Rad GelDoc Chemilumineszenz-Detektionssystem gescannt und dokumentiert.

Ponceau S-Färbelösung	30g Trichloroaceticacid 5g Ponceau S
-----------------------	---

	Aufgefüllt mit destilliertem Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 1 Liter
5 x PBS	40g NaCl 1g KCl 7,2g Na ₂ HPO ₄ 1,2g KH ₂ PO ₄ Aufgefüllt mit destilliertem Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 1 Liter
Transferpuffer	15,125g Tris 72,05g Glycin 1 Liter Methanol Aufgefüllt mit destilliertem Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 5 Litern
ECL-Lösung	<i>ECL-I:</i> 10 ml 1M Tris pH 8,5 1ml Luminol stock 440µl Para-hydroxy Coumarinsäure (PCA) Aufgefüllt mit destilliertem Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 100ml <i>ECL-II:</i> 10 ml 1M Tris pH 8,5

	64µl H ₂ O ₂ Aufgefüllt mit destilliertem Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 100ml
--	---

2.2.3. Dotblot-Experimente

(durchgeführt von Dr. Silke Wahl)

Gleiche Mengen von Dynaminpeptiden wurden durch die Inkubation mit Glutaraldehyd (Konzentration: 1% in PBS) für eine Stunde auf Eis kreuzverlinkt. Anschließend wurde NaBH₄ (0,1% f.c.) für 15 Minuten bei Raumtemperatur zur Blockierung der noch freien Aldehydgruppen hinzugegeben. 50 µg des kreuzverlinkten Peptids wurden in 5µl Tropfen auf eine Nitrozellulosemembran gegeben. Eine gleiche Menge von unkonjugiertem BSA diente als Negativkontrolle, um etwaige unspezifische Bindungen auszuschließen.

BSA und die Peptidlösungen wurden für ca. 15 Minuten trockenen gelassen. Anschließend wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt und das Ergebnis dokumentiert. Nach Entfärbung der Membran mittels PBS, wurde die Membran für 60 Minuten in einer Lösung aus 5%igem Magermilchpulver und PBS gegeben, um unspezifische Proteinbindungsstellen der Membran zu blocken. Dann wurde mit dem Anti-Dynamin 1xb Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Primärantikörpersignale durch mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Sekundärantikörper (Verdünnung 1:10.000) und nachfolgender "enhanced chemoluminescence (ECL)" sichtbar gemacht. Die ECL-Signale wurden einem Bio-Rad GelDoc Chemilumineszenz-Detektionssystem gescannt und dokumentiert.

2.2.4. Hell- und Dunkeladaptation von Mäusen

(durchgeführt von Ekta Dembla)

Es wurden 10 Wochen alte Mäuse genutzt. Die Mäuse wurden gleichzeitig entweder für 4,5 Stunden in Licht ($\geq 30 \text{ cd/m}^2$) oder komplette Dunkelheit gesetzt. Die gleichzeitige Hell- oder

Dunkeladaptation der Mäuse wurde durchgeführt, um einen möglichen Einfluss eines zirkadianen Rhythmus auf die Experimente zu minimieren. Die Experimente wurden zwischen 12:00 Uhr und 16:30 Uhr (um 12:00 Uhr gestartet und um 16:30 Uhr beendet) durchgeführt. Die Dunkeladaptation fand in einem Raum mit $<0,008 \text{ cd/m}^2$ Lichtintensität statt (gemessen mit einem X9-1 Optometer ausgestattet mit einem LDM-9901-04 Luminanzdetektor; Gigahertz-Optik; Germany). Anschließend wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation nach vorheriger Anästhesie mittels Isofluran getötet. Die Isolation der Augen von lichtadaptierten Mäusen wurde durchgeführt wie von Grabner et al. (2015) beschrieben. Die Entnahme der Augen von dunkeladaptierten Mäusen fand unter Infrarotlicht statt, das nur eine minimale Auswirkung auf die Exzitation von retinalen Neuronen hat. Nach der Entnahme wurden die Augen sofort in eine physiologische Salzlösung gegeben, die 0.5 mM Ca^{2+} -Ionen enthielt. Anschließend wurde sie auf den Retina Dissektionsplatz unter dem Mikroskop platziert. Das Standard-Binokular für die Detektion von sichtbarem Licht wurde durch ein Infrarotdetektionssystem (FJW optical system infrared viewers; Cat. No. 84499A) ersetzt. Ein Infrarotlicht (Conrad Electronics, Model no. CCD-328H) wurde in der Nähe des Dissektionsplatzes aufgestellt und ein zusätzliches Infrarotlicht (NITECORE, Chameleon series CI6, 850nm infrared light, 1500mW) wurde horizontal zum Dissektionsplatz montiert, um eine bessere Infrarotausleuchtung zu gewährleisten. Des Weiteren wurde der vordere Teil des Auges mit einer Nadel punktiert und die Linse sowie der Glaskörper wurden durch einen zirkulären Schnitt mittels Dissektionsscheren entfernt. Der hintere Augenbecher mit der Retina wurde in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan kryokonserviert, wie zuvor beschrieben (Schmitz, Königstorfer, und Südhof 2000; Grabner et al. 2015). Die Einbettung der Proben wurden wie unter Kapitel 2.2.1.2 beschrieben durchgeführt (Wahl, Katiyar, und Schmitz 2013).

3 Ergebnisse

3.1 Dotblot Experimente

3.1.1 Dotblot Testung des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers

(durchgeführt von Dr. Silke Wahl)

Der in der vorliegenden Doktorarbeit verwendete monoklonale Antikörper wurde gegen die 12 carboxyterminalen Aminosäuren von Dynamin 1xb generiert (PPGVPRITISDP; aa840-aa851 of rat dynamin1; „PP12“). Das carboxyterminale 7er Peptid (RITISDP; „RP7“) ist spezifisch für Dynamin 1xb, während das aminoternale 5er Peptid (PPGV; „PP5“) auch in Dynamin 1xa enthalten ist (Xue et al., 2011; Bodmer et al., 2011). Um festzustellen, welche Region des 12er Polymers der monoklonale Anti-Dynamin 1xb Antikörper Klon 1E10 erkennt, wurden Dotblotexperimente durchgeführt. Es wurden alle drei Peptide auf die Reaktivität zu dem Anti-Dynamin 1xb Antikörper getestet. Nur bei Verwendung der PP12 und RP7 Peptide wurde ein Signal detektiert. PP5 wurde auch mit hohen Konzentrationen nicht erkannt. Daraus lässt sich schließen, dass der Antikörper spezifisch die 7 carboxyterminalen Aminosäuren erkennt und damit spezifisch für die Splicevariante Dynamin 1xb ist. Es waren schon kleine Mengen des RP7 Peptids ausreichend, sodass bereits 7ng des Peptids von dem monoklonalen Antikörper detektiert wurden. Dabei zeigte sich, dass die Sensitivität gegenüber dem RP7 Peptid sogar noch ausgeprägter war als die gegenüber dem PP12 Peptid.

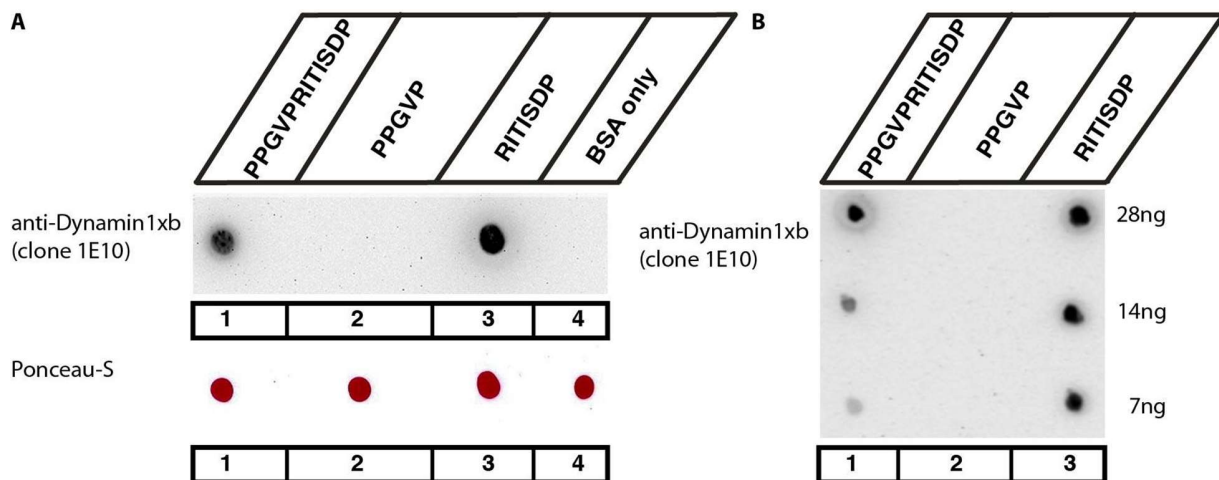


Abbildung 8. Dotblotexperimente mit Anti-Dynamin 1xb

A Drei verschiedene Peptide des carboxyterminalen Endes von Dynamin 1 wurden auf die Reaktivität gegenüber dem monoklonalen Dynamin 1xb Antikörper (Klon 1E10) getestet. Die oben genannten Peptide ("PP12": PPGVPRITISDP, "PP5": PPGVP, "RP7": RITISDP) wurden mit BSA kreuzverlinkt und auf eine Nitrozellulosemembran gegeben. BSA ohne Peptid diente als Negativkontrolle. Es konnte nur bei den Peptiden PP12 (1) und PR7 (3) eine Reaktion gegenüber dem Anti-Dynamin 1xb Antikörper detektiert werden. Das Peptid PP5 und BSA wiesen keine Reaktion auf. Die Ponceau S Färbung diente dem Nachweis, dass auf allen 4 Stellen Protein aufgetragen wurde.

B Die Reaktivität des Anti-Dynamin 1xb Antikörpers wurde bei verschiedenen Peptidmengen getestet. Hierbei zeigte sich, dass schon 7 ng des 7er Peptids ausreichend waren (3), um eine Reaktion gegenüber dem Anti-Dynamin 1xb Antikörper zu zeigen. Die Sensitivität gegenüber dem RP7 Peptid war sogar stärker als gegenüber dem PP12 Peptid. (Durchgeführt von Dr. Silke Wahl)

3.2 Western Blot Analysen

3.2.1 Western Blot Testung des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers in verschiedenen Geweben der Maus

Western Blot Experimente dienen dem qualitativen und semiquantitativen Nachweis von Proteinen. Um den selbsthergestellten monoklonalen Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörper, der sich gegen die spezielle Splicevariante Dynamin 1xb richtet (siehe Material und Methoden) in verschiedenen Geweben zu testen, wurden daher zuerst Western Blot Experimente durchgeführt. Dazu wurden, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, sechs Gewebe der Maus entnommen: Niere, Darm, Cerebellum, Rückenmark, Retina und Neocortex. Mit diesen Gewebslysaten wurden die Western Blot Analysen anschließend durchgeführt. Um eine gleichmäßige Proteinbeladung zu gewährleisten, wurde zunächst eine Proteinbestimmung mittels der Amidoschwarzmethode durchgeführt und anschließend jeweils 15 µg Protein aufgetragen. Außerdem wurde zur Ladungskontrolle mit Anti-Aktin C4 inkubiert und gleichmäßige Proteinbanden an der zu erwartenden Stelle bei 42kDa in allen sechs Geweben detektiert (Abbildung 8 a). Danach wurde die Nitrozellulosemembran ohne Entfernung (Stripping) der Antikörper mit Dynamin 1xb (Klon 1E10) inkubiert. Nach Inkubation mit dem mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper konnten Proteinbanden im Cerebellum, im Rückenmark, in der Retina und im Neocortex bei den für Dynamin zu erwartenden 100 kDa detektiert werden (Abbildung 8 a). Im Darm und in der Niere war bei den gegebenen Aktin-Konzentrationen kein Dynaminprotein mit dem Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörper nachzuweisen. Abbildung 8b zeigt die Western Blot Experimente nach Inkubation nur mit dem Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörper. Es konnte somit gezeigt werden, dass dieser Antikörper nur eine Proteinfraction bei ≈ 100 kDa erkennt.

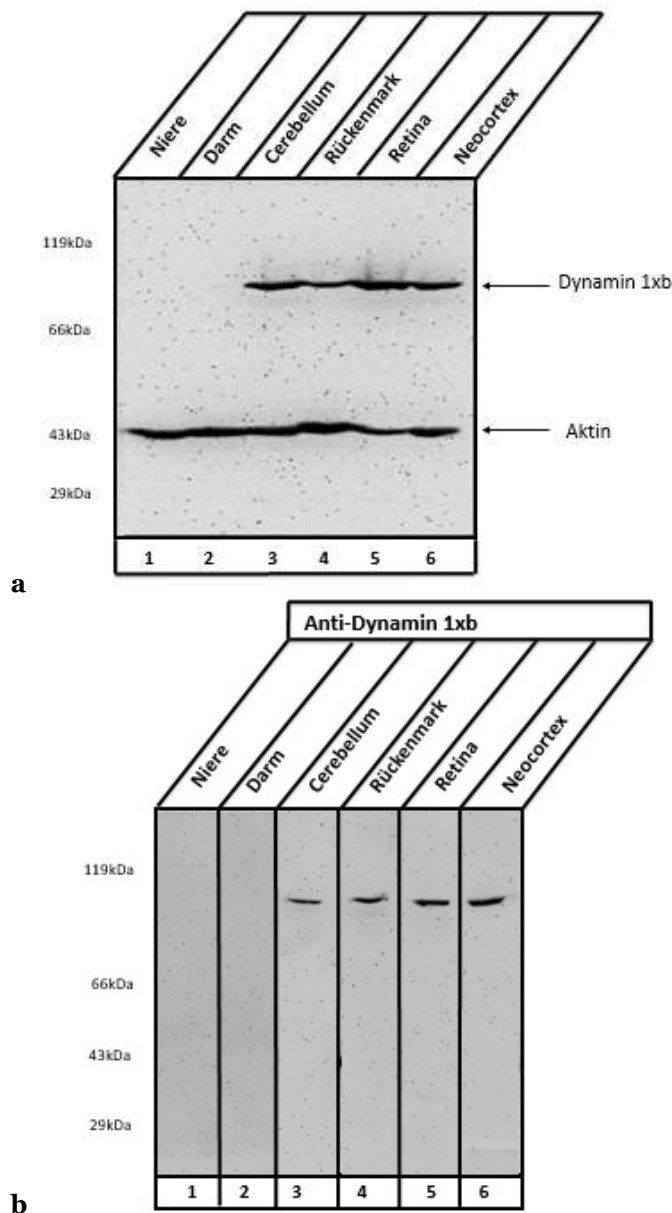


Abbildung 9. Ladungskontrolle mit Anti-Aktin und Detektion von Dynamin mit Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) in Western Blot Analysen

a Ladungskontrolle durch Inkubation mit Anti-Aktin. Die Proteine wurden im 10%igen Acrylamid SDS-PAGE aufgetrennt. Eine Immunreaktion zeigte sich für Aktin bei der zu erwartenden Größe von 42 kDa. Dieselbe Nitrozellulosemembran wurde anschließend mit Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) inkubiert. Es wurde zusätzlich zu dem Aktinsignal ein Signal für Dynamin bei der zu erwartenden Größe von ≈ 100 kDa nachgewiesen.

b Detektion von Dynamin 1xb (Klon 1E10). Die Proteine wurden in 10%igem Acrylamid SDS-PAGE aufgetrennt. Es zeigte sich nach Inkubation mit dem Dynamin 1xb Antikörper die zu erwartende Immunreaktion bei ≈ 100 kDa in Cerebellum, Rückenmark, Retina und Neocortex. In Niere und Darm wurde keine Immunreaktion beobachtet.

3.2.2 Präabsorptionsexperimente

Um nachzuweisen, dass die Antikörperbindung des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers an die aufgetrennte Proteinfraction spezifisch war, wurden Präabsorptionsexperimente durchgeführt. Dazu wurde der Antikörper wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben entweder mit dem spezifischen Antigen (CPPGVPRITISDP, im Folgenden als Dynaminpeptid bezeichnet) oder einem irrelevanten Peptid (im Folgenden als Kontrollpeptid bezeichnet) zusammengegeben und über Nacht inkubiert, bevor die so behandelten Antikörper für die Western Blot Analyse eingesetzt wurden. Als Ladungskontrolle diente erneut ein Nachweis von Aktin. Es wurden in den einzelnen Geweben jeweils gleiche Proteinmengen an Aktin detektiert. Anschließend wurde ohne Antikörper Stripping jeweils ein Streifen eines Gewebes mit Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) + Kontrollpeptid oder der andere Streifen mit Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) + Dynaminpeptid inkubiert. Es konnten jeweils nur in den Inkubationen von Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) + Kontrollpeptid Proteinbanden bei den zu erwartenden 100 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 9).

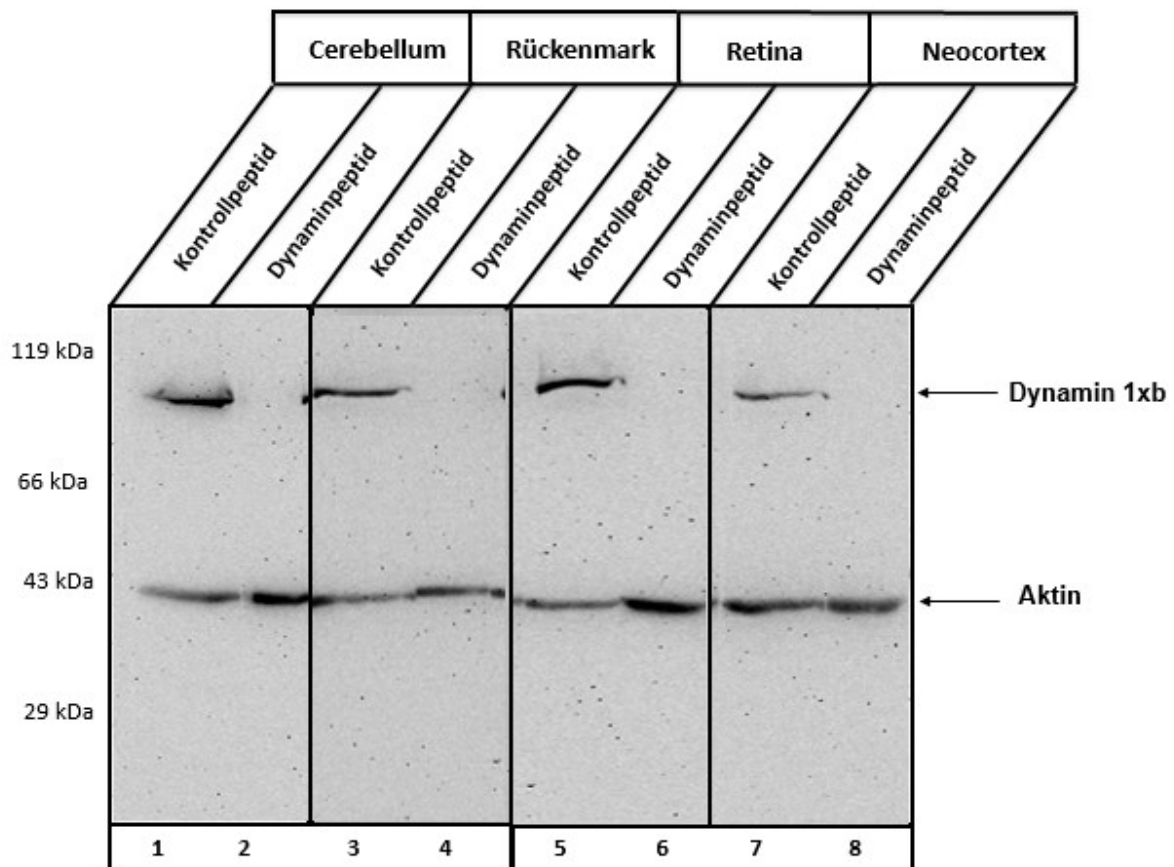


Abbildung 10. Präabsorptionsexperimente in Western Blot Analysen

Cerebellum: die Streifen 1 und 2 wurden zur Ladungskontrolle mit Anti-Aktin inkubiert. Anschließend wurde der Streifen 1 mit Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) + Kontrollpeptid und der Streifen 2 mit Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) + Dynaminpeptid inkubiert.

Rückenmark: die Streifen 3 und 4 wurden zur Ladungskontrolle mit Anti-Aktin inkubiert. Anschließend wurde der Streifen 3 mit Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) + Kontrollpeptid und der Streifen 4 mit Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) + Dynaminpeptid inkubiert.

Retina: die Streifen 5 und 6 wurden zur Ladungskontrolle mit Anti-Aktin inkubiert. Anschließend wurde der Streifen 5 mit Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) + Kontrollpeptid und der Streifen 6 mit Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) + Dynaminpeptid inkubiert.

Neocortex: die Streifen 7 und 8 wurden zur Ladungskontrolle mit Anti-Aktin inkubiert. Anschließend wurde der Streifen 7 mit Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) + Kontrollpeptid und der Streifen 8 mit Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) + Dynaminpeptid inkubiert.

Dynaminsignale an der zu erwartenden Stelle von 100 kDa konnten nur in den Kontrollexperimenten 1, 3, 5 und 7 gefunden werden. In den anderen Experimenten wurde der Dynamin 1xb Antikörper vorher durch Bindung an sein spezifisches Dynaminpeptid absorbiert, sodass sich kein Signal bei 100 kDa mehr zeigte.

3.3 Immunfluoreszenzexperimente

Nachdem die Spezifität des Antikörpers durch Western Blot Experimente gezeigt werden konnte, wurden Immunfluoreszenz-Versuche durchgeführt, um die genaue Lokalisation von Dynamin 1xb in den entsprechenden Geweben zu bestimmen. Die Immunfluoreszenzexperimente wurden an Plastik-eingebetteten Semidünnschnitten (0,5µm dick) durchgeführt, da gezeigt werden konnte, dass durch ihre geringe Dicke eine bessere räumliche Auflösung als mit konventionellen Kryoschnitten erzielt werden kann (Punge u. a. 2008).

3.3.1 Lokalisation von Dynamin 1xb im Cerebellum der Maus

Zur Lokalisation von Dynamin im Cerebellum der Maus wurden die Semidünnschnitte mit dem Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörper inkubiert. Um die Detektion Dynamins in Beziehung mit anderen subzellulären Strukturen setzen zu können, wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen entweder mit den synaptischen Vesikel-Proteinen SV2 oder Synaptotagmin 1 und dem aktive Zonen-Proteinen RIM 1/2 durchgeführt.

3.3.1.1 Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Dynamin 1xb und RIM 1/2

Im folgenden Kapitel wird die Lokalisation von Dynamin 1 in Korrelation mit RIM 1/2 im Cerebellum der Maus dargestellt. Dynamin 1xb konnte in allen Schichten des cerebellären Cortexes gefunden werden (siehe Abbildung 11). Eine besondere Anreicherung zeigte sich in den Synapsenansammlungen der Glomeruli cerebellares im Stratum granulosum (siehe Abbildung 15). Auch die zahlreichen synaptischen Verbindungen im Stratum moleculare konnten mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden (Abbildung 13). Im cerebellären Mark konnte keine vergleichbar starke Anreicherung Dynamins nachgewiesen werden (Abbildung 12). Für die aktive-Zonen-Proteine RIM 1/2, die Calcium-abhängig die

Exozytose synaptischer Vesikel regulieren, konnte ein ähnliches Verteilungsmuster gefunden werden. Die Immunfluoreszenzaufnahmen in diesem Kapitel wurden mit Hilfe des Epifluoreszenzmikroskops Axiovert 200M der Firma Zeiss aufgenommen (siehe Kapitel 2.2.1.6).

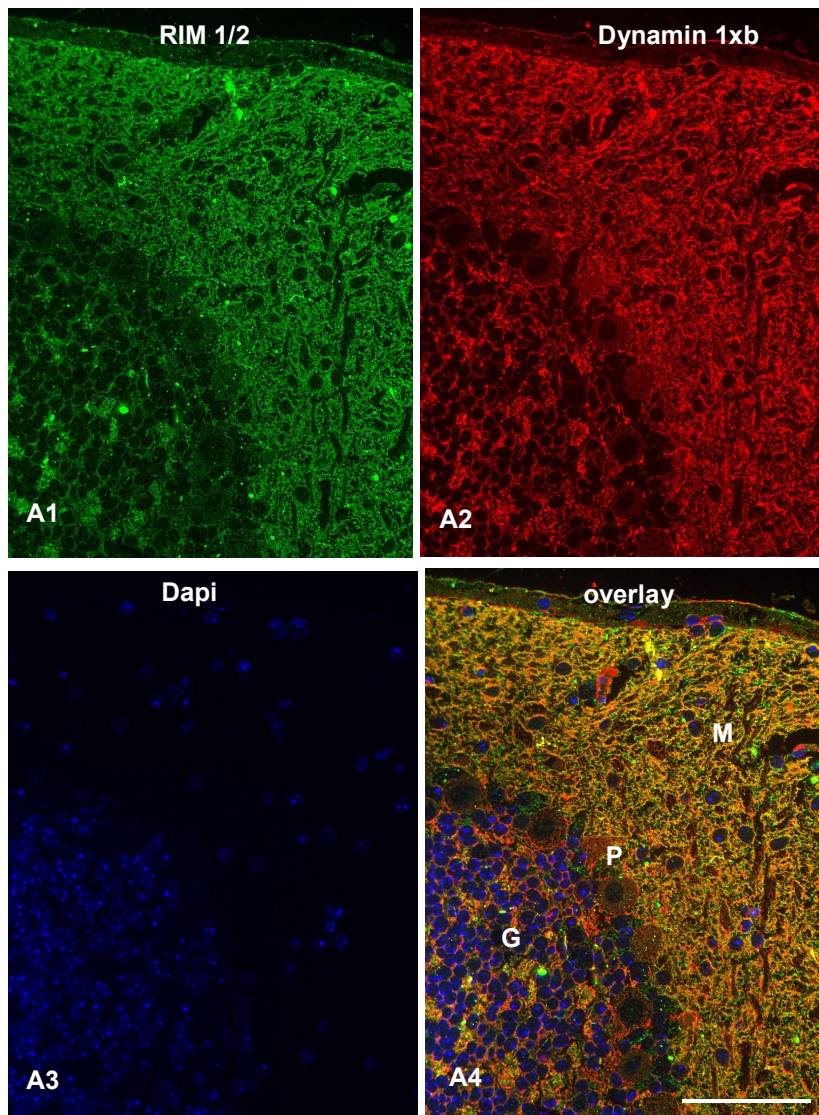


Abbildung 11. Lokalisation von Dynamin 1xb im cerebellären Cortex der Maus

0,5µm-dünne Schnitte des cerebellären Mauscortex doppel-immunfluoreszenz-gefärbt mit dem polyklonalen Antikörper gegen RIM 1/2 und dem monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1xb (Klon 1E10). Dynamin und RIM finden sich stark anreichert in den Synapsen des cerebellären Cortexes (Glomeruli cerebellares in Stratum granulosum und den Synapsen des Stratum moleculare). Abkürzungen M: Stratum moleculare; P: Stratum purkinjense; G: Stratum granulosum. Maßbalken: 50µm

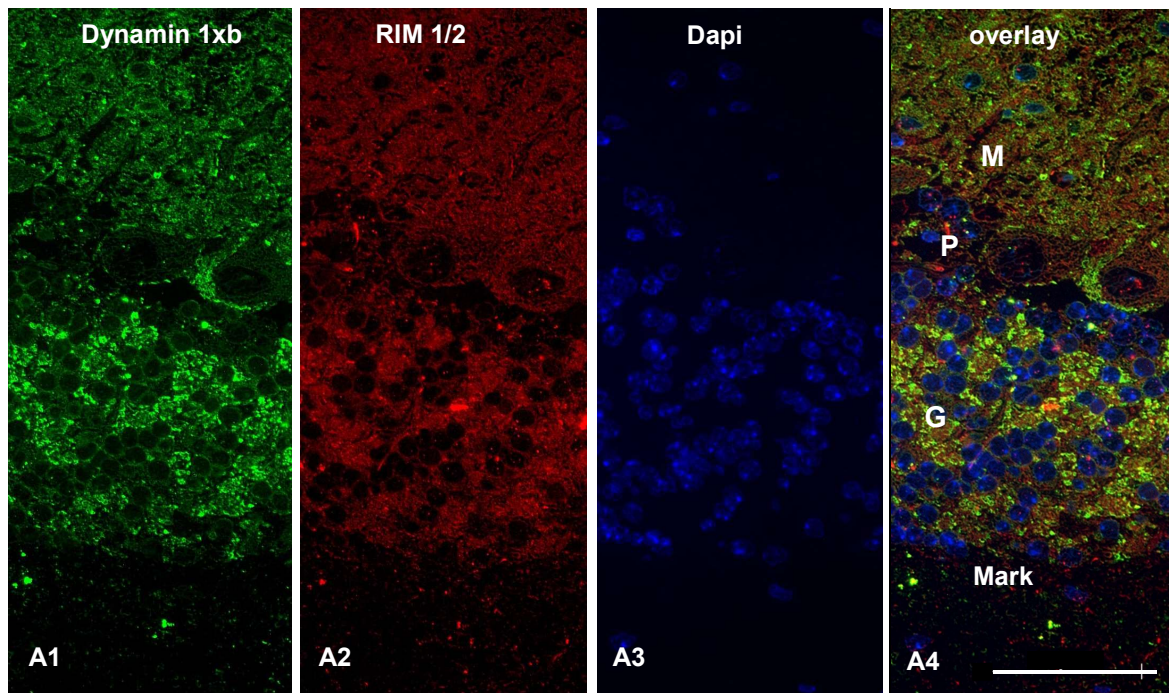


Abbildung 12. Verteilung von Dynamin 1xb und RIM 1/2 im Cerebellum der Maus

0,5µm-dünne Schnitte des Cerebellums der Maus doppel-immunfluoreszenz-gefärbt mit dem polyklonalen Antikörper gegen RIM1/2 und dem monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1xb (Klon 1E10). Immunsignale für beide Proteine finden sich im cerebellären Cortex. M: Stratum moleculare; P: Stratum purkinjense; G: Stratum granulosum. Maßstab: 50µm

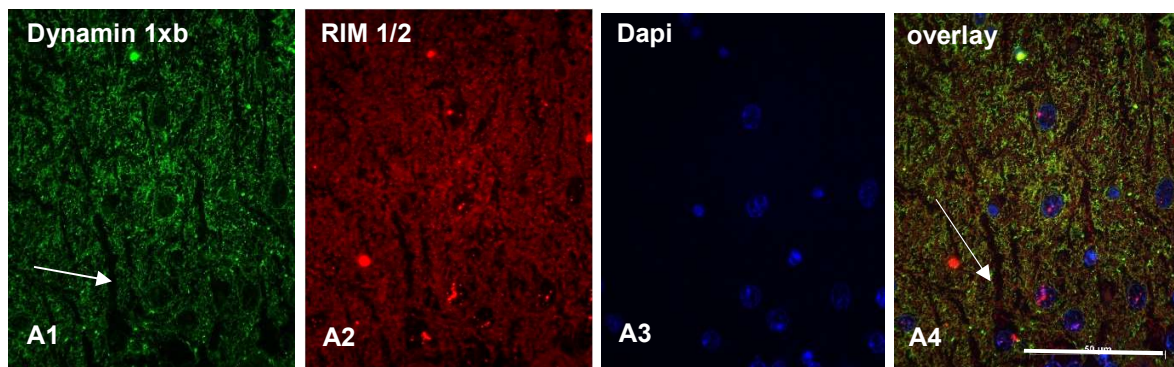


Abbildung 13. Verteilung von Dynamin 1xb im Stratum moleculare

0,5µm-dünne Schnitte des cerebellären Mauscortexes doppel-immunfluoreszenz-gefärbt mit dem polyklonalen Antikörper gegen RIM1/2 und dem monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1xb (Klon 1E10). Pfeil deutet auf den Dendritenbaum einer Purkinje-Zelle, an dem sich zahlreiche Synapsen befinden. Beide Proteine finden sich angereichert im Stratum moleculare. Maßbalken: 50µm

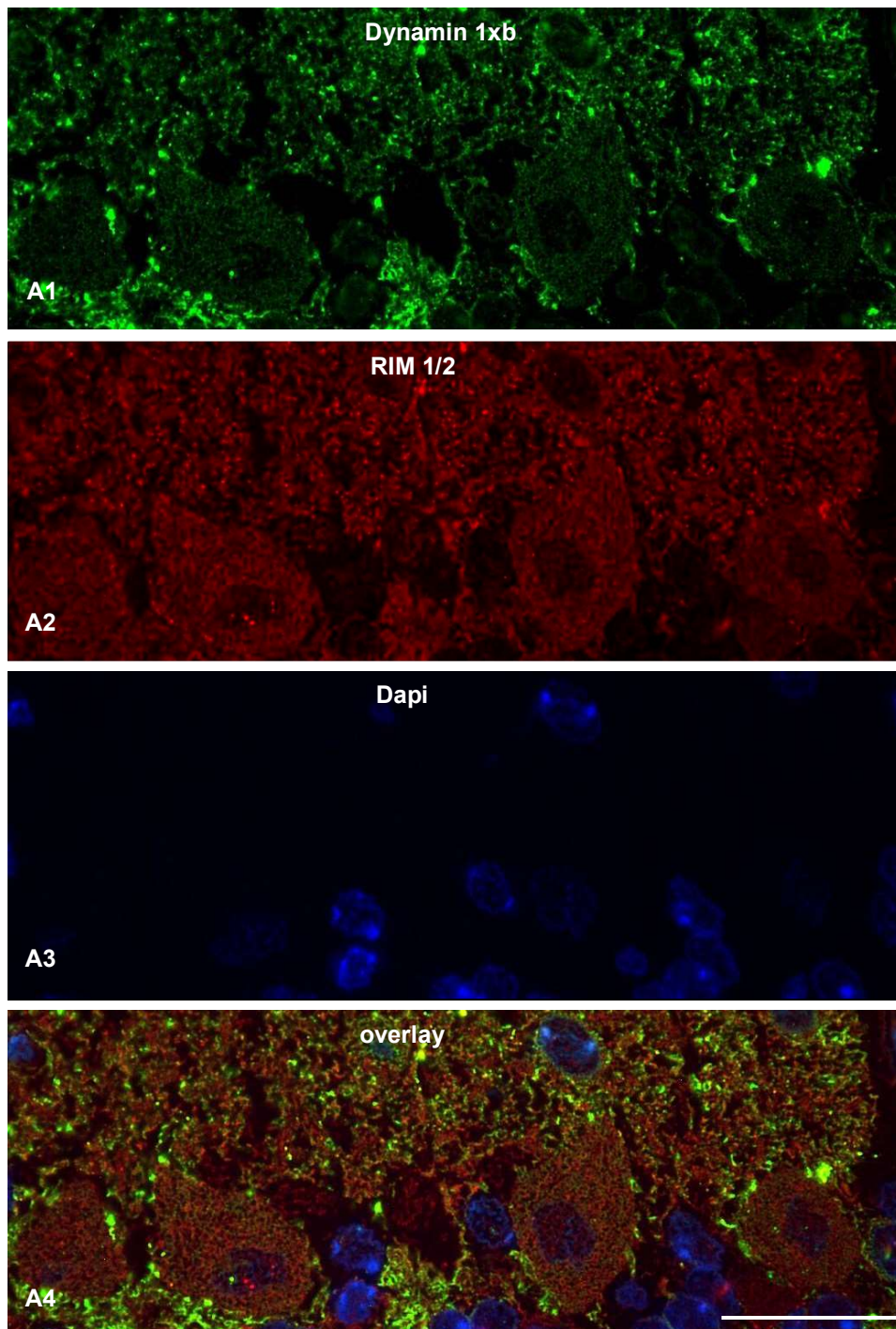


Abbildung 14. Vorkommen von Dynamin 1xb im Stratum purkinjense

0,5µm-dünne Schnitte des cerebellären Mauseortexes doppel-immunfluoreszenz-gefärbt mit dem polyklonalen Antikörper gegen RIM 1/2 und dem monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1xb (Klon 1E10). Dynamin zeigt ein starkes Immunsignal um die Zellkörper der Purkinjezellen. Maßbalken: 20µm

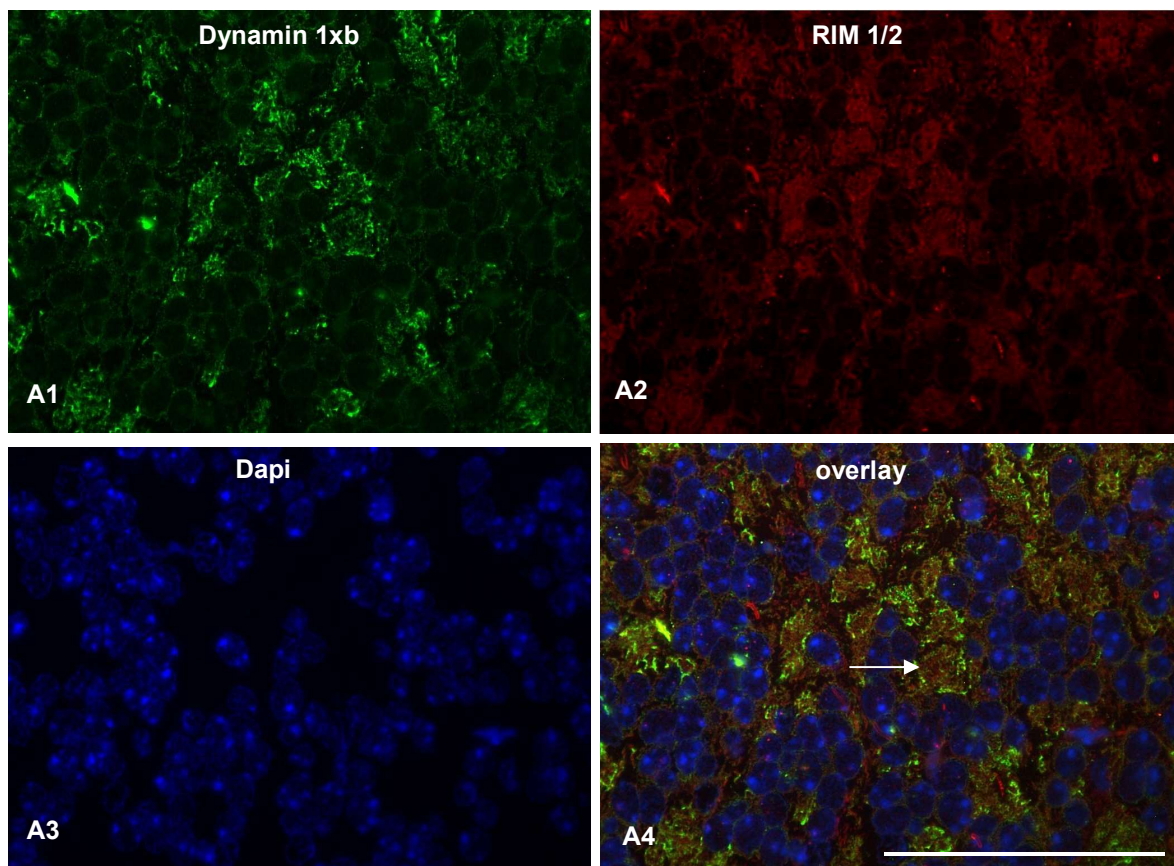


Abbildung 15. Verteilung von Dynamin 1xb im Stratum granulosum

0,5µm-dünne Schnitte des cerebellären Mauseortexes doppel-immunfluoreszenz-gefärbt mit dem polyklonalen Antikörper gegen RIM 1/2 und dem monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1xb (Klon 1E10). Der Pfeil deutet auf einen Synapsenkorb eines Glomerulus cerebellaris, in dem beide Proteine ein starkes Immunsignal zeigen. Maßbalken: 50µm

3.3.1.1 Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Dynamin 1xb und Synaptotagmin 1

Synaptotagmin 1 ist das Calcium-Sensor-Protein synaptischer Vesikel. Bei ausreichendem intrazellulärem Calcium-Niveau bindet es sowohl an den SNARE-Komplex als auch an Lipide in der Plasmamembran und leitet so die Exozytose synaptischer Vesikel ein (Shin 2014). Weiterhin ist Synaptotagmin 1 durch seine Bindung an AP2 und Stonin auch an der Clathrin-abhängigen Endozytose beteiligt (Yao et al. 2012; Zhang u. a. 1994; Haucke et al. 2000; Diril et al. 2006). Durch die Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Dynamin 1xb und

Synaptotagmin 1 kann die Lokalisation von Dynamin 1xb in Korrelation zu synaptischen Vesikeln dargestellt werden. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 200M der Firma Zeiss angefertigt (siehe Kapitel 2.2.1.6).

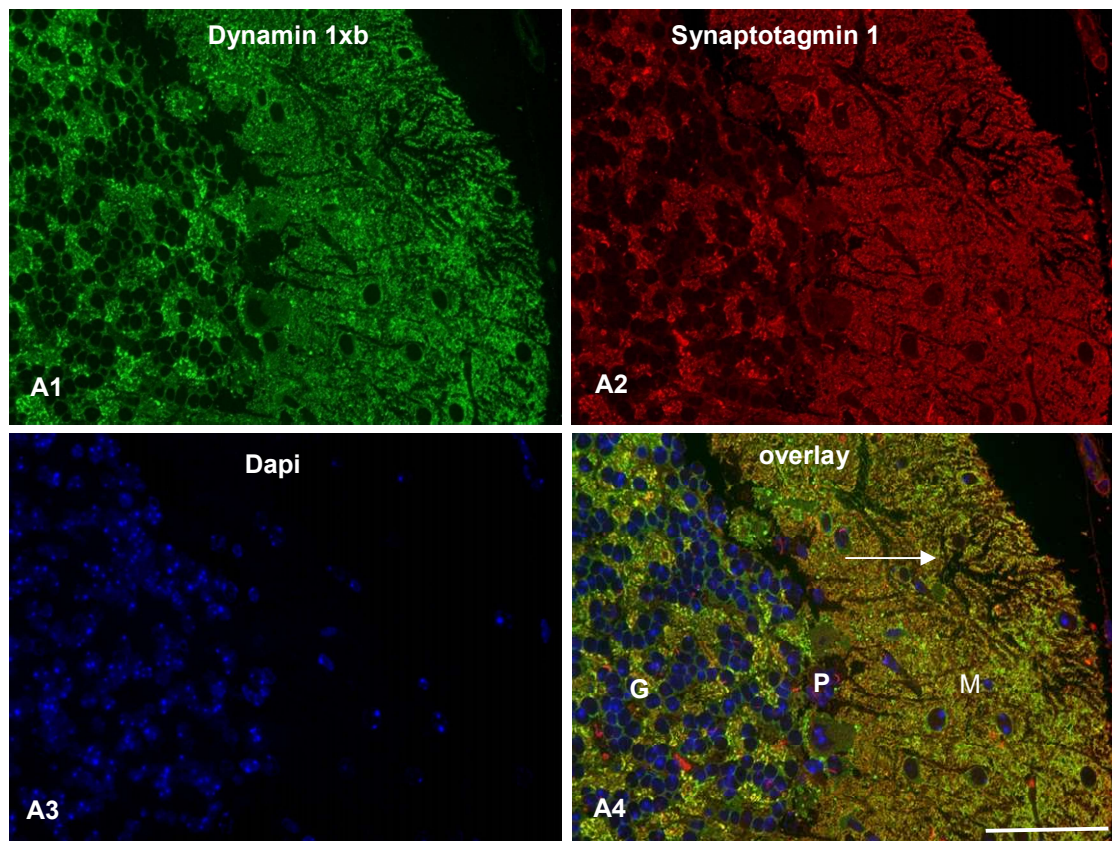


Abbildung 16. Doppelimmunfluoreszenzfärbung von Dynamin 1xb und Synaptotagmin 1 im cerebellären Cortex

0,5µm-dünne Schnitte des cerebellären Mäusecortexes doppel-immunfluoreszenz-gefärbt mit dem polyklonalen Antikörper gegen Synaptotagmin 1 und dem monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1xb (Klon 1E10). Beide Proteine finden sich stark angereichert in allen Schichten des cerebellären Cortexes. Der Pfeil deutet auf einen Dendritenbaum einer Purkinje-Zelle. An dem Dendritenbaum enden zahlreiche Synapsen. Hier kann auch eine stärkere Anreicherung von Dynamin 1xb festgestellt werden. M: Stratum moleculare; P: Stratum purkinjense; G: Stratum granulosum. Maßbalken: 50µm

Dynamin 1xb kann auch hier, ebenso wie Synaptotagmin 1, in allen Schichten des cerebellären Cortexes nachgewiesen werden (Abbildung 16). Synaptotagmin 1 zeigt ebenfalls eine starke Anreicherung in den Glomeruli cerebellares des Stratum granulosum

und im Stratum moleculare. Im cerebellären Mark konnte keine vergleichbar starke Anreicherung festgestellt werden (Abbildung 17).

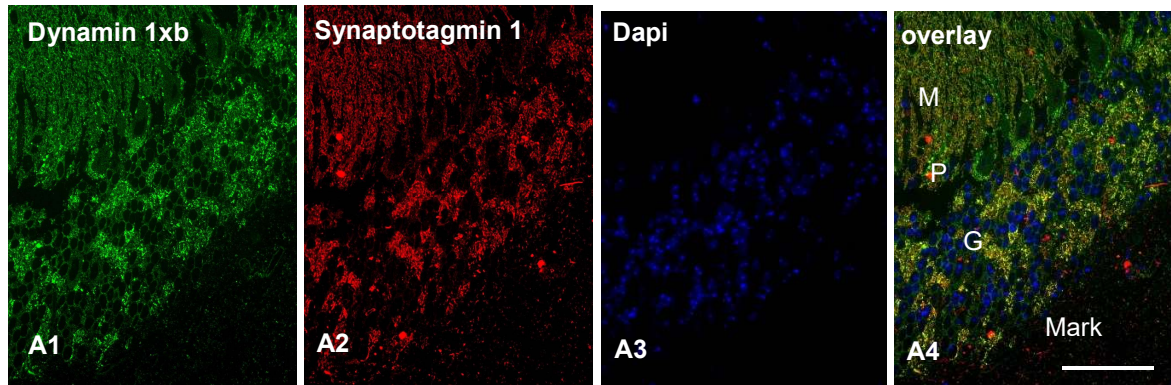


Abbildung 17. Verteilung von Dynamin 1xb und Synaptotagmin im Cerebellum der Maus

0,5µm-dünne Schnitte des cerebellären Cortexes der Maus doppel-immunfluoreszenz-gefärbt mit dem polyklonalen Antikörper gegen Synaptotagmin 1 und dem monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1xb (Klon 1E10). Im cerebellären Mark konnten keine vergleichbar starken Immunfluoreszenzsignale von Dynamin 1xb und Synaptotagmin 1 detektiert werden. M: Stratum moleculare; P: Stratum purkinjense; G: Stratum granulosum. Maßbalken: 50µm

3.3.1.3 Präabsorptionsexperimente zum Nachweis der Spezifität des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers im Cerebellum der Maus

Der Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörper wurde in seiner entsprechenden Verdünnung entweder mit dem speziellen Dynaminpeptid oder einem Kontrollpeptid über Nacht inkubiert (siehe Kapitel 2.2.1.4). Anschließend wurden die beiden Arbeitslösungen in den Immunfluoreszenzmarkierungen verwendet. Bei Inkubation der Semidünnschnitte des Mauscerebellums mit den präabsorbierten Anti-Dynamin 1xb Antikörpern konnte im Fall der Präabsorption mit dem spezifischen Peptid kein Immunfluoreszenzsignal detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Inkubation des mit dem irrelevanten Kontrollpeptid blockierten Antikörpers die gleichen Immunfluoreszenzsignale wie in Kapitel 3.2.1.1 und 3.2.1.2: eine starke Anreicherung des Immunsignals im cerebellären Cortex und keine vergleichbar starken Signale im cerebellären Mark. Zur Gewebekontrolle wurde mit dem monoklonalen Antikörper Anti-panSV2 (erkennt alle SV2 Varianten) inkubiert. Das SV2-Protein ist integraler Membranbestandteil des synaptischen Vesikels und wurde verwendet,

um die präsynaptischen Terminalen zu markieren (Buckley und Kelly 1985; Bajjalieh et al. 1993). Die Experimente wurden so durchgeführt wie in der Abwandlung der Färbemethode mit dem Einsatz zweier monoklonaler Antikörpern unter 2.2.1.2 beschrieben. Das synaptische Vesikelprotein SV2 konnte im gesamten cerebellären Cortex gefunden werden. Im cerebellären Mark hingegen zeigten sich keine Immunfluoreszenzsignale. Die Immunfluoreszenzsignale wurden mit Hilfe des Konfokalmikroskops AR1 der Firma Nikon (siehe Kapitel 2.2.1.5) aufgenommen.

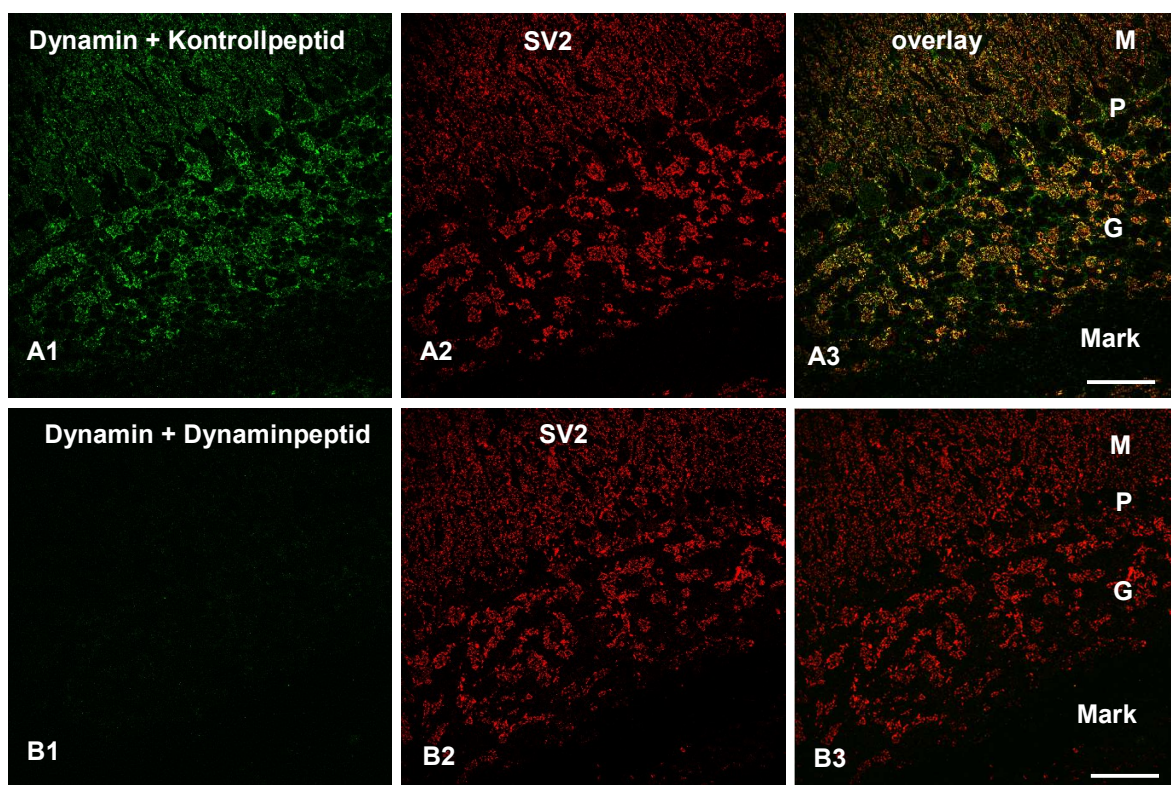
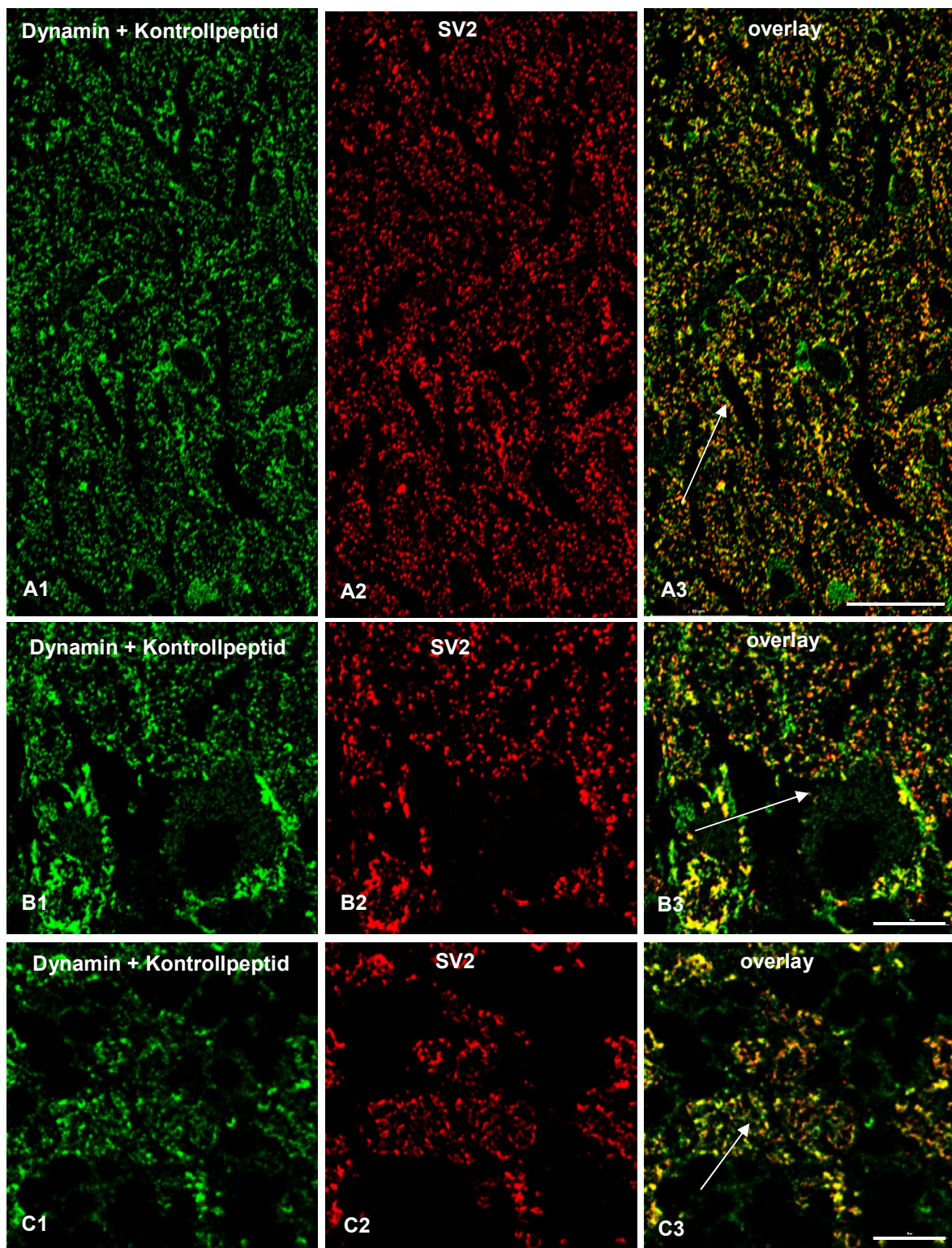


Abbildung 18. Präabsorptionsexperimente des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers im Cerebellum der Maus

0,5µm-dünne Schnitte des cerebellären Cortexes der Maus doppel-immunfluoreszenz-gefärbt mit dem monoklonalen Antikörper Anti-panSV2 und dem monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1xb (Klon 1E10), der entweder vor seinem Einsatz mit einem irrelevanten Kontrollpeptid (**A**) oder dem spezifischen Dynaminpeptid (**B**) inkubiert wurde. Es konnte nur in den Kontrollexperimenten (**A**) ein Signal für Dynamin detektiert werden. In den Präabsorptionsexperimenten (**B**) wiederum wurde das Dynaminsignal durch das spezifische Dynaminpeptid präabsorbiert. Abkürzungen: M: Stratum moleculare; P: Stratum purkinjense; G: Stratum granulosum Maßbalken: 30µm



(Legende auf der nächsten Seite)

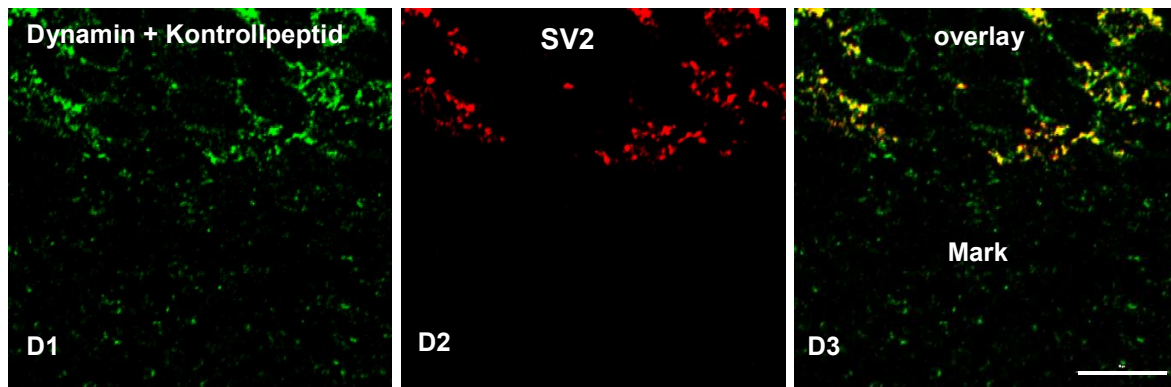


Abbildung 19. Detailaufnahmen der Kontrollexperimente mit Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) und Anti-panSV2

0,5µm-dünne Schnitte des cerebellären Mauscortexes doppel-immunfluoreszenz-gefärbt mit dem monoklonalen Antikörper Anti-panSV2 und dem monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1xb (Klon 1E10), vorher inkubiert mit einem irrelevanten Kontrollpeptid. Dynamin konnte angereichert in allen Schichten des cerebellären Cortexes gefunden werden, ebenso wie SV2. In den Glomeruli cerebellares und um die Purkinjezellen herum zeigte Dynamin ein starkes Fluoreszenzsignal. Im cerebellären Mark zeigte sich keine vergleichbare Anreicherung beider Proteine.

A Detailaufnahme aus dem Stratum moleculare. Pfeil deutet auf den Dendritenbaum einer Purkinje-Zelle. Messbalken: 20 µm

B Detailaufnahme aus dem Stratum purkinjense. Pfeil deutet auf eine Purkinje-Zelle. Maßstab: 10 µm.

C Detailaufnahme aus dem Stratum granulosum. Pfeil deutet auf einen Glomerulus cerebellaris. Maßbalken: 10µm

D Detailaufnahme an der Grenze von Mark (weiße Substanz) zum Stratum granulosum (graue Substanz). Maßbalken: 10µm

3.3.2 Lokalisation von Dynamin 1xb in der Retina der Maus

Dynamin 1 findet sich in der Retina, wie zuvor beschrieben (Wahl, Katiyar, und Schmitz 2013; Wahl u. a. 2016), stark angereichert in den beiden synaptischen Schichten, dem Stratum plexiforme internum (Inner Plexiform Layer, IPL) und dem Stratum plexiforme externum (Outer Plexiform Layer, OPL). Um die Lokalisation von Dynamin 1xb genauer beschreiben zu können, wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit dem synaptischen Ribbon-Protein RIBEYE und Dynamin 1xb durchgeführt. RIBEYE kann ebenfalls in der OPL (synaptische Verbindung zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen) und in der IPL (synaptische Verbindung zwischen Bipolar- und Ganglienzellen) gefunden werden. In den Doppelimmunfluoreszenzfärbungen konnten Dynamin 1xb und RIBEYE nahe beieinander liegend detektiert werden. Im Konfokalmikroskop zeigten sich dabei im Stratum plexiforme

externum ringförmige Immunreaktionen für Dynamin 1xb um die synaptischen Ribbons herum (Abbildung 19).

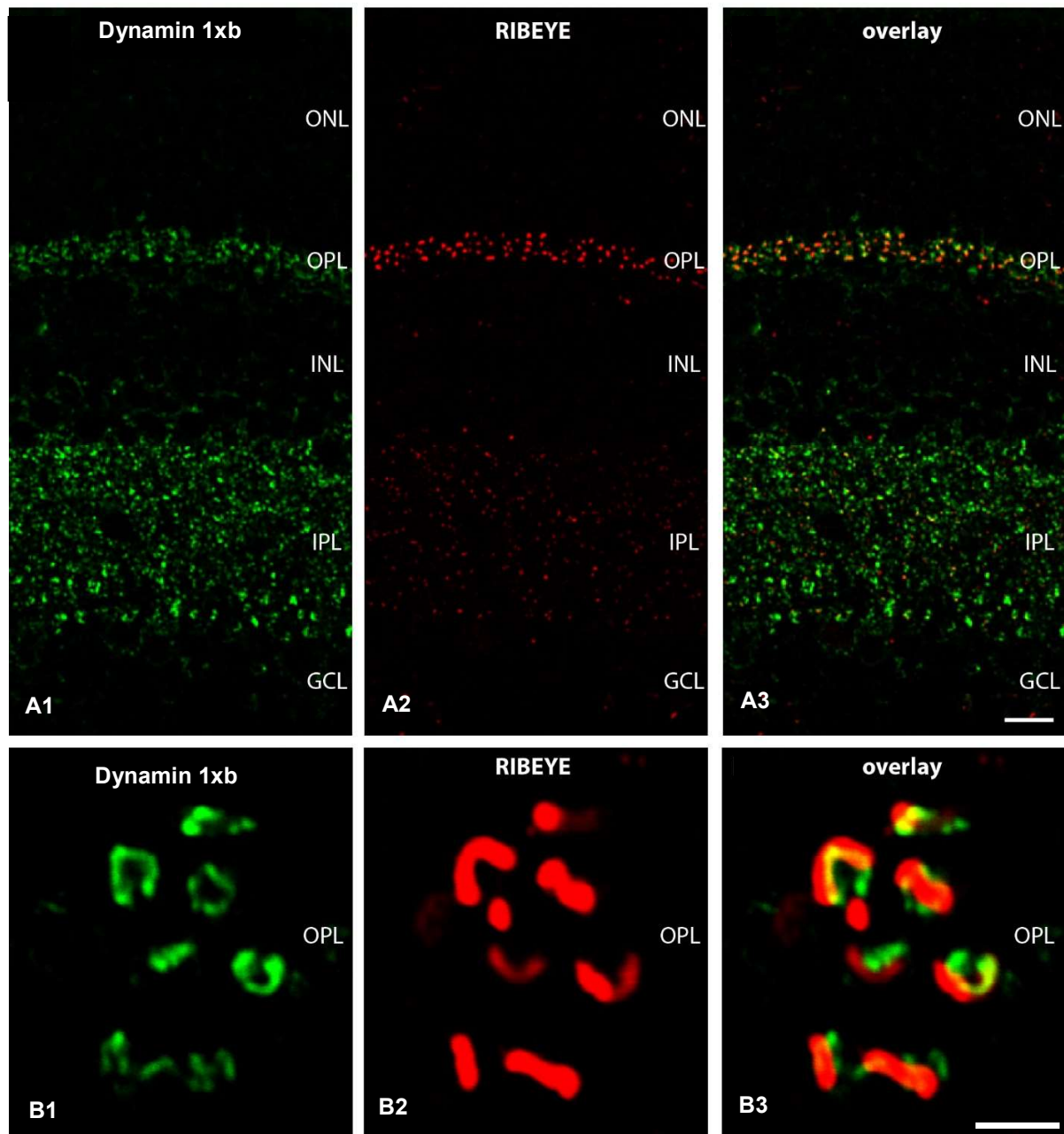


Abbildung 20. Lokalisation von Dynamin 1xb in der Retina

0,5µm-dünne Schnitte der Mause retina doppel-immunfluoreszenz-gefärbt mit dem polyklonalen Antikörper gegen RIBEYE und dem monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1xb (Klon 1E10). RIBEYE findet sich in den beiden synaptischen Schichten (OPL und IPL), wo es die synaptischen

Ribbons aufbaut. Dynamin1xb findet sich ebenfalls in der OPL und IPL. Abkürzungen: GCL = ganglion cell layer; IPL = inner plexiform layer; INL = inner nuclear layer; OPL = outer plexiform layer; ONL = outer nuclear layer. Maßbalken: A1-A3 10µm, B1-B3: 1µm

3.3.2.1 Präabsorptionsexperimente zum Nachweis der Spezifität des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers in der Retina der Maus

Auch in der Retina wurden Präabsorptionsexperimente mit dem Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörper durchgeführt (das Prozedere ist in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben). In den Experimenten, in denen der Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörper mit dem spezifischen Dynaminpeptid präabsorbiert wurde, konnten keine Dynamin-spezifischen Immunsignale detektiert werden (Abbildung 21 B, Abbildung 22 B, Abbildung 23 B). In den Kontrollexperimenten wurden die gleichen Dynaminsignale, wie zuvor beschrieben, identifiziert (Abbildung 21 A, Abbildung 22 A, Abbildung 23 A).

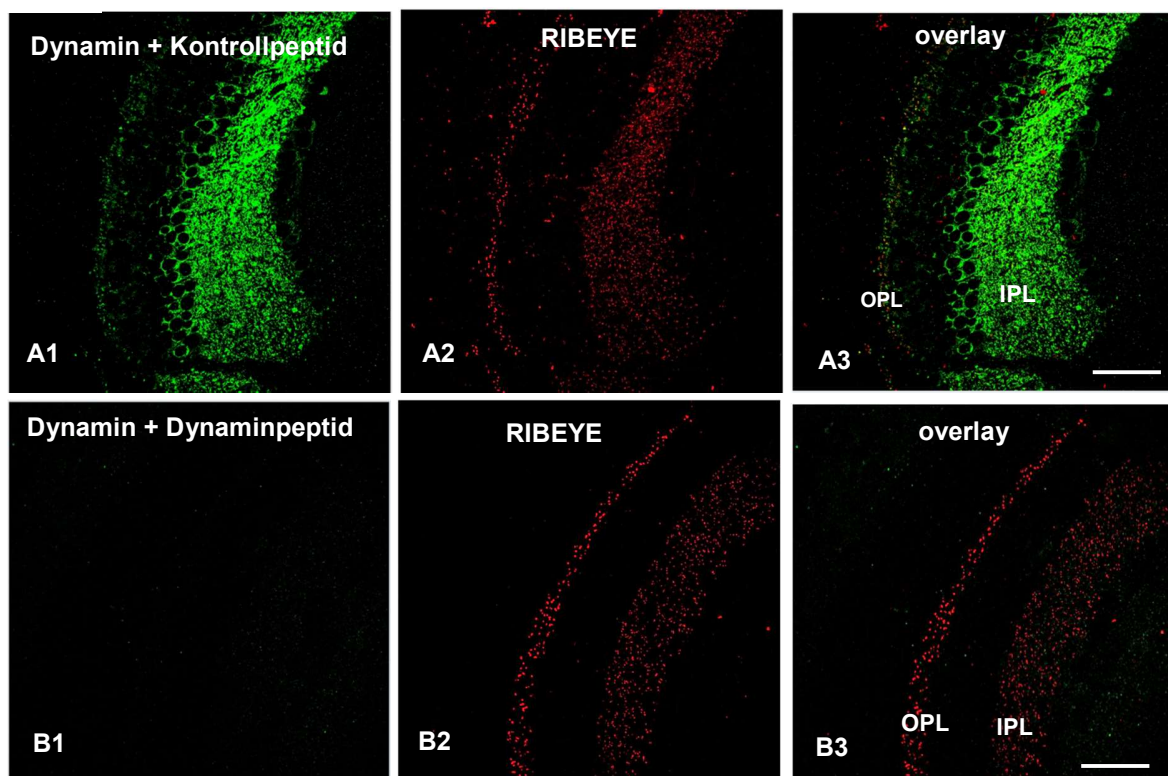


Abbildung 21. Präabsorptionsexperimente des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers in der Retina der Maus. Übersichtsaufnahme (Legende auf der nächsten Seite)

0,5µm-dünne Schnitte der Mausretina doppel-immunfluoreszenz-gefärbt mit dem polyklonalen Antikörper gegen RIBEYE und dem monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1xb (Klon 1E10). Der Dynamin-Antikörper wurde vor seinem Einsatz entweder mit einem irrelevanten Kontrollpeptid (**A**) oder mit seinem spezifischen Dynaminpeptid (**B**) inkubiert. In den Kontrollexperimenten (**A**) konnte ein Dynamin-spezifisches Immunfluoreszenzsignal gefunden werden. In (**B**) konnte das Dynaminsignal komplett blockiert werden. Abkürzungen: IPL = inner plexiform layer; OPL = outer plexiform layer. Maßbalken: 50µm

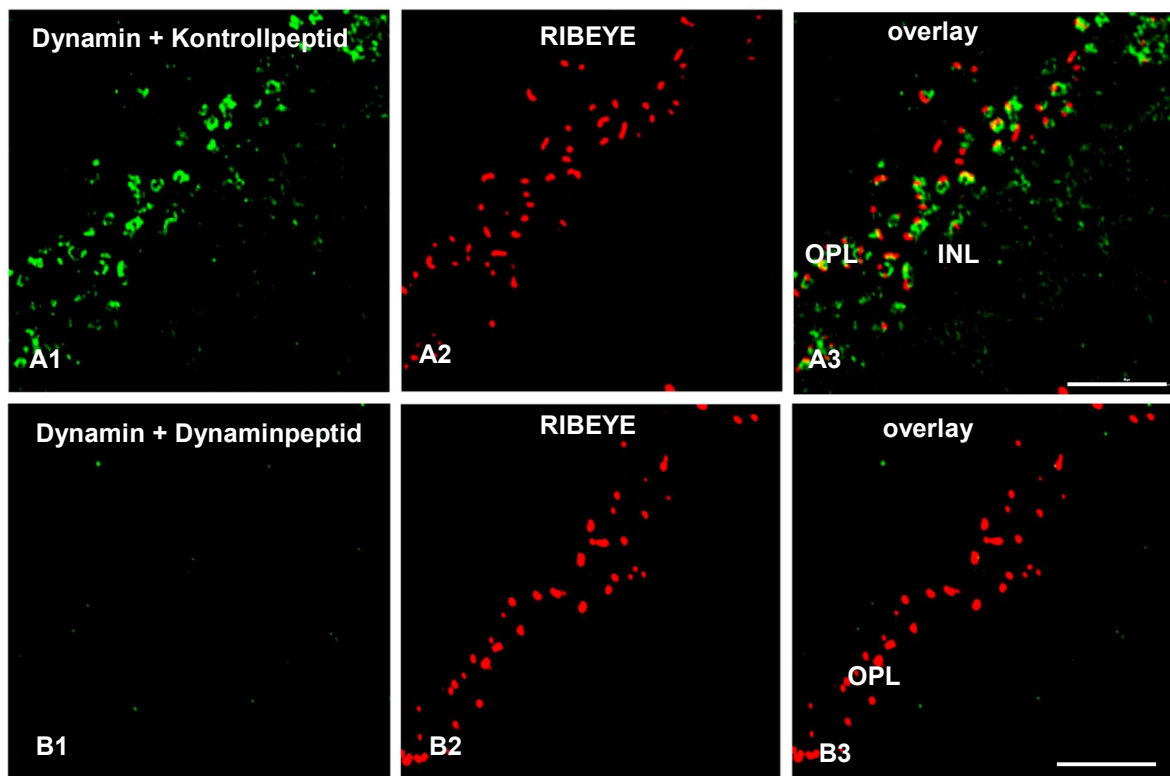


Abbildung 22. Präabsorptionsexperimente des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers in der Retina der Maus. Übersichtsaufnahme aus der OPL

0,5µm-dünne Schnitte der Mausretina doppel-immunfluoreszenz-gefärbt mit dem polyklonalen Antikörper gegen RIBEYE und dem monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1xb (Klon 1E10), der entweder vorher mit einem irrelevanten Kontrollpeptid (**A**) oder mit dem spezifischen Dynaminpeptid (**B**) inkubiert wurde. Nur in (**A**) konnten die Dynamin-spezifischen Immunsignale in der OPL gefunden werden. Abkürzungen: INL = inner nuclear layer; OPL = outer plexiform layer. Maßstab: 10 µm

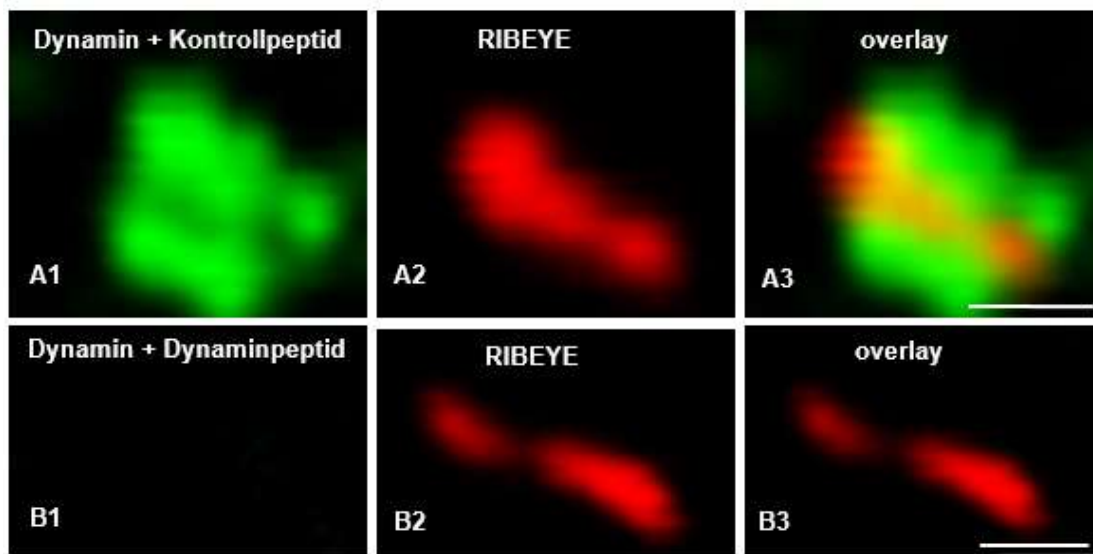


Abbildung 23. Präabsorptionsexperimente des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers in der Retina der Maus. Detailaufnahme aus der OPL

0,5µm-dünne Schnitte der Mausretina doppel-immunfluoreszenz-gefärbt mit dem polyklonalen Antikörper gegen RIBEYE und dem monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1xb (Klon 1E10), der entweder vorher mit einem irrelevanten Kontrollpeptid (**A**) oder mit dem spezifischen Dynaminpeptid (**B**) inkubiert wurde. Nur in (**A**) konnten die Dynamin-spezifischen Immunsignale in der OPL gefunden werden. In (**B**) hingegen konnte der Antikörper durch das spezifische Peptid präabsorbiert werden. Maßbalken: 0,5µm

3.3.3 Lokalisation von Dynamin 1xb im visuellen Cortex der Maus

Im visuellen Cortex der Maus wurde Dynamin 1xb mittels des monoklonalen Antikörpers Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) detektiert. Seine Lokalisation wurde mit Hilfe von Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit den beiden synaptischen Vesikelproteinen SV2 und Synaptotagmin 1 und den aktive-Zonen-Proteinen RIM 1/2 genauer bestimmt.

3.3.3.1 Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Dynamin 1xb und Synaptotagmin 1

Dynamin 1xb konnte in allen Schichten des visuellen Cortexes der Maus gefunden werden. Zur genaueren Lokalisation innerhalb der jeweiligen Schichten des Cortexes wurden Doppelimmunfluoreszenzexperimente durchgeführt. Um die Präsynapse darzustellen, wurde mit dem synaptischen Vesikelprotein Synaptotagmin 1 inkubiert. Synaptotagmin 1 ist das Calcium-Sensor-Protein synaptischer Vesikel. Es bindet Calcium-abhängig an SNARE-Proteine und Lipide in der Plasmamembran und leitet so die Exozytose synaptischer Vesikel ein (Shin 2014). Synaptotagmin 1 konnte, wie Dynamin, in allen Schichten des visuellen Cortexes der Maus gefunden werden. Beide Proteine zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster. Die mit DAPI gefärbten Zellkerne zeigten keine Immunfluoreszenzsignale der beiden Proteine. Aufgezeichnet wurden die Immunsignale in diesem Kapitel mit dem Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 200M der Firma Zeiss (siehe Kapitel 2.2.1.6)

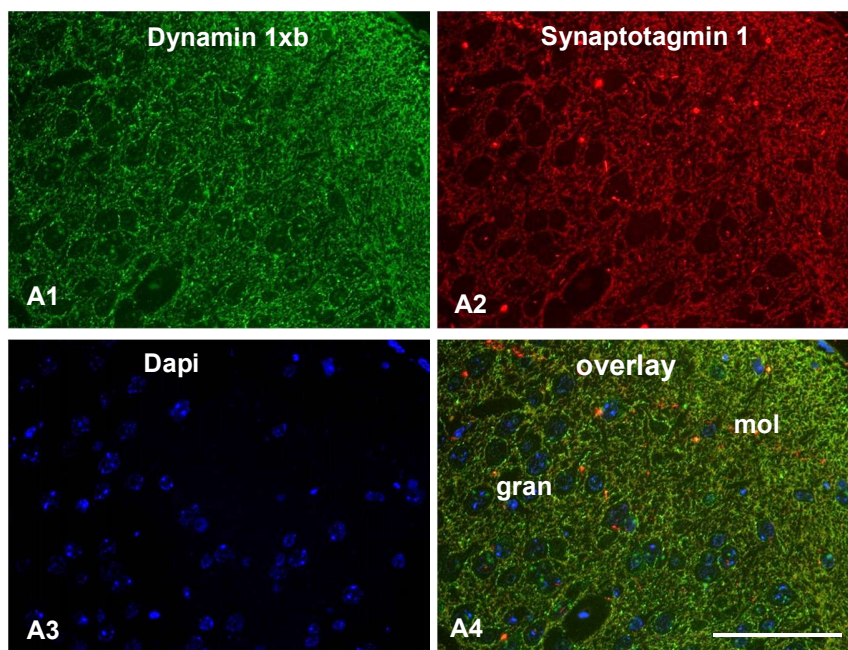
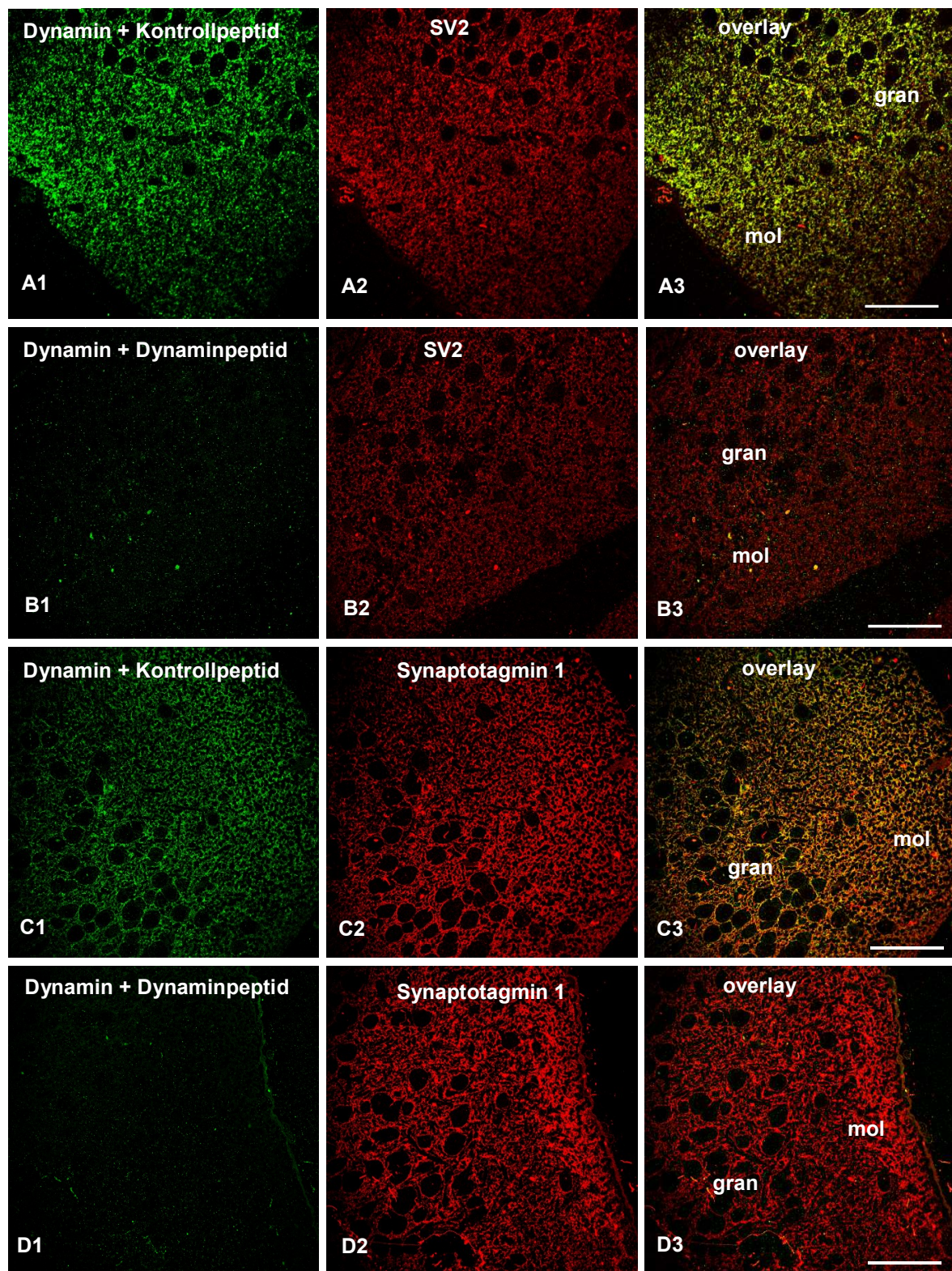


Abbildung 24. Lokalisation von Dynamin 1xb im visuellen Cortexes der Maus

Semidünnschnitte des visuellen Cortexes der Maus doppel-immunfluoreszenz-gefärbt mit dem polyklonalen Antikörper gegen Synaptotagmin 1 und dem monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1xb (Klon 1E10). Beide Proteine zeigen eine Anreicherung im visuellen Cortex unter Aussparung der Zellkerne. mol= Stratum moleculare, gran= Lamina granularis externa. Maßbalken: 50µm

3.3.3.2 Präabsorptionsexperimente zum Nachweis der Spezifität des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers im visuellen Cortex der Maus

Auch im visuellen Cortex der Maus wurden Präabsorptionsexperimente mit dem Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörper durchgeführt. Das Prozedere ist in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben. In den Experimenten, in denen der Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörper mit einem spezifischen Dynaminpeptid vorher absorbiert wurde, konnten keine Dynamin-spezifischen Immunsignale detektiert werden (Abbildung 25 B, D und F). In den Kontrollexperimenten wurden die gleichen Dynaminsignale, wie zuvor beschrieben, identifiziert. Dynamin fand sich in allen Schichten des visuellen Cortexes unter Aussparung der Zellkerne (Abbildung 25 A, C und E). Die Immunsignale wurden im Folgenden mittels des Konfokalmikroskops der Firma Nikon (A1R, siehe Kapitel 2.2.1.5) aufgenommen. Zur Gewebe- und Lokalisationskontrolle wurden die Semidünnschnitte entweder mit den synaptischen Vesikelproteinen SV2 oder Synaptotagmin 1 oder dem aktive-Zonen-Protein RIM 1/2 inkubiert. Um SV2 zu detektieren, wurde der Anti-panSV2 Antikörper verwendet. Die Experimente mit dem SV2-Antikörper wurden so durchgeführt wie in der Abwandlung der Färbemethode mit dem Einsatz zweier monoklonaler Antikörpern unter 2.2.1.2 beschrieben. SV2 konnte dabei in allen Schichten des visuellen Cortexes gefunden werden. Des Weiteren wurde mit dem polyklonalen Antikörper gegen Synaptotagmin 1 inkubiert. Es zeigten sich die gleichen Immunfluoreszenzsignale wie in Kapitel 3.2.3.1. Anschließend wurde das Prozedere mit dem polyklonalen Antikörper gegen RIM 1/2 wiederholt. RIM 1/2 konnte dabei ebenfalls in allen Schichten des visuellen Cortexes gefunden werden. In den Zellkernen des visuellen Cortexes konnten keine Immunfluoreszenzsignale von einem der Proteine detektiert werden.



(Legende auf der nächsten Seite)

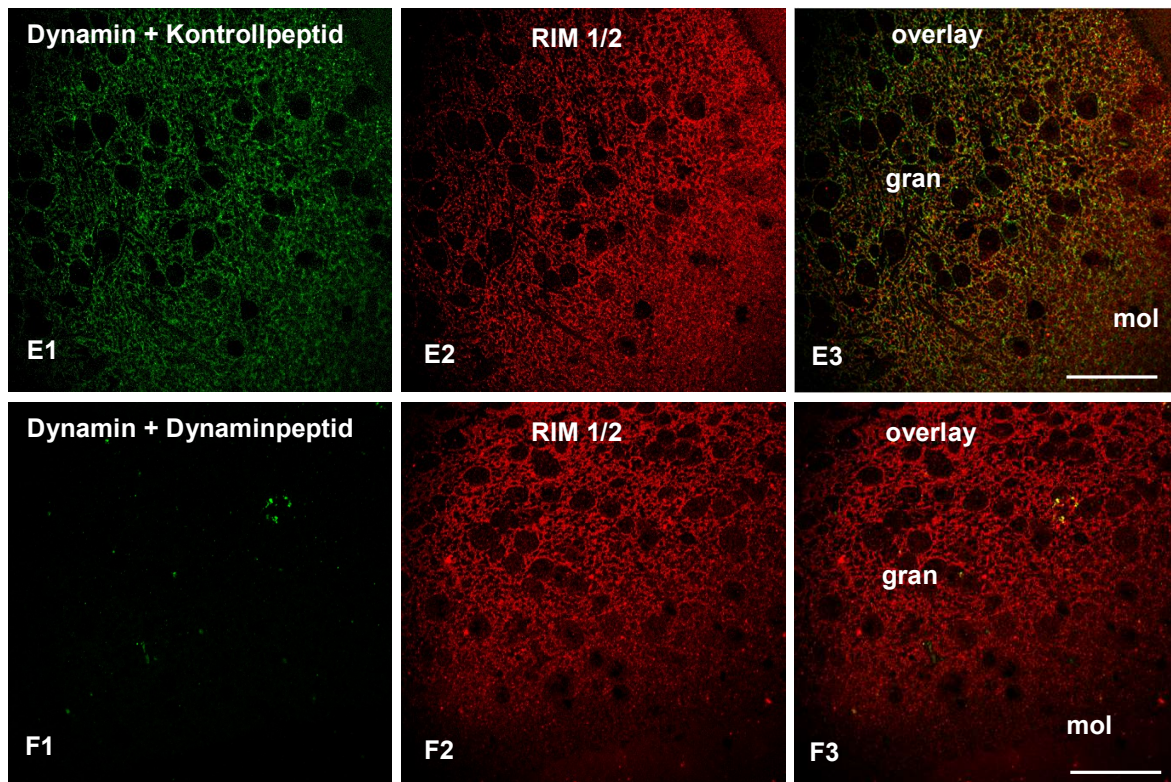


Abbildung 25. Präabsorptions- und Kontrollexperimente des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers im visuellen Cortex der Maus

Semidünnschnitte des visuellen Cortexes der Maus doppel-immunfluoreszenz-gefärbt mit dem monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1xb (Klon 1E10) und jeweils entweder mit dem monoklonalen Antikörper gegen SV2 (**A** und **B**) oder mit den polyklonalen Antikörpern gegen Synaptotagmin 1 (**C** und **D**) oder RIM 1/2 (**E** und **F**). Der Dynamin-Antikörper wurde vor seinem Einsatz entweder mit einem irrelevanten Kontrollpeptid (**A**, **C** und **E**) oder dem seinem spezifischen Dynaminpeptid (**B**, **D** und **F**) inkubiert. Das spezifische Peptid präabsorbierte das Dynaminsignal komplett (**B**, **D** und **F**), während das Kontrollpeptid keinen Einfluss auf die spezifischen Immunsignale des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers hatte (**A**, **C** und **E**). mol= Stratum moleculare, gran= Lamina granularis externa. Maßbalken = 25 μ m.

3.3.4 Lokalisation von Dynamin 1xb im Rückenmark der Maus

Dynamin 1xb wurde im Rückenmark der Maus mittels des monoklonalen Antikörpers Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) lokalisiert. Um das Vorkommen von Dynamin 1xb genauer beschreiben zu können, wurden Doppelimmunfluoreszenzexperimente durchgeführt. Dabei wurden die 0,5µm dünnen Schnitte des Mausrückemarks simultan mit dem monoklonalen Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörper und entweder dem polyklonalen Antikörper gegen die aktive-Zonen-Proteine RIM 1/2, dem polyklonalen Antikörper gegen Synaptotagmin 1 oder dem polyklonalen Antikörper gegen β -Tubulin inkubiert.

3.3.4.1 Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Dynamin 1xb und RIM 1/2

Dynamin 1xb konnte in der grauen Substanz des Rückenmarks nachgewiesen werden (Abbildung 26). In der grauen Substanz finden sich die synaptischen Verbindungen des Rückenmarks. Hier werden also Neurotransmitter per Exozytose ausgeschüttet und anschließend per Endozytose wieder aus dem synaptischen Spalt entfernt. In der weißen Substanz, in der die axonalen Faserbahnen verlaufen, konnte hingegen kein vergleichbar starkes Signal gefunden werden (Abbildung 27). Die aktive-Zonen-Proteine RIM 1/2 zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster. Auch RIM 1/2 konnte in der grauen Substanz gefunden werden. Die Zellkerne, die mittels DAPI angefärbt wurden, zeigten keine Anreicherung der beiden Proteine. Die Immunsignale wurden mit dem Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 200M der Firma Zeiss aufgenommen.

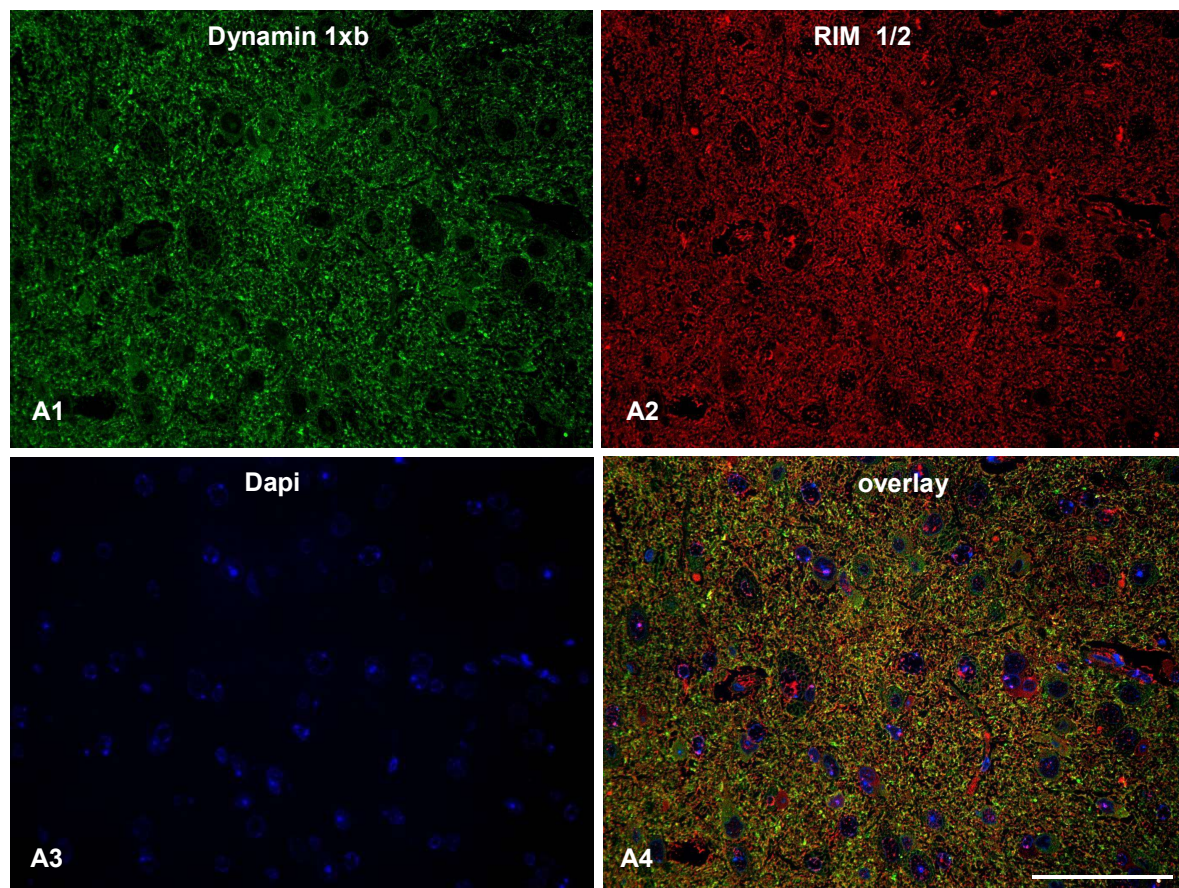


Abbildung 26. Dynamin 1xb und RIM 1/2 in der grauen Substanz des Rückenmarks der Maus

0,5µm dünne Schnitte der grauen Substanz des Rückenmarks der Maus doppel-immunfluoreszenzgefärbt mit dem polyklonalen Antikörper gegen RIM 2 und dem monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1xb (Klon 1E10). Beide Proteine finden sich stark angereichert und mit einem ähnlichen Verteilungsmuster. Maßstab: 50µm

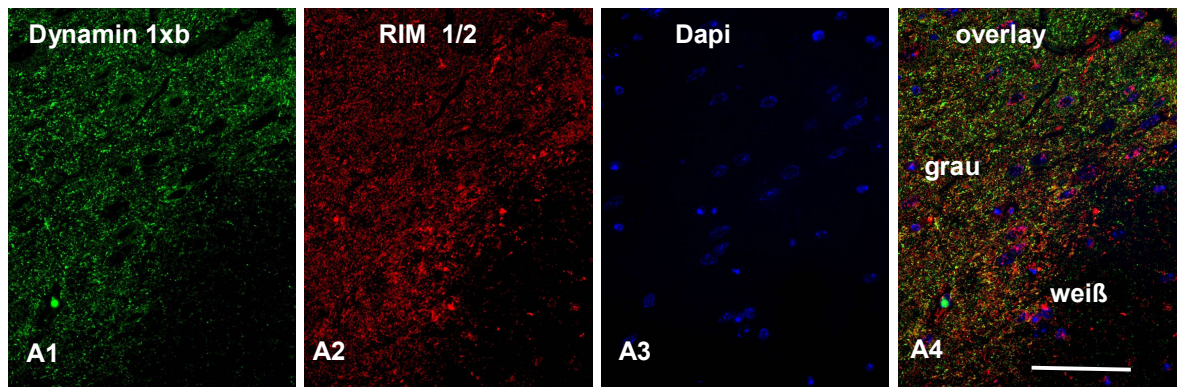


Abbildung 27. Verteilung Dynamin 1xb und RIM 1/2 in der grauen und weißen Substanz des Mause Rückenmarks

0,5µm dünne Schnitte Rückenmarks der Maus doppel-immunfluoreszenz-gefärbt mit dem polyklonalen Antikörper gegen RIM 1/2 und dem monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1xb (Klon 1E10). Beide Proteine finden sich in der grauen Substanz angereichert, während sie keine vergleichbar starken Signale in der weißen Substanz aufweisen. Abkürzungen: grau = graue Substanz; weiß = weiße Substanz. Maßstab: 50µm

3.3.4.2 Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Dynamin 1xb und Synaptotagmin 1

Zur Darstellung der synaptischen Vesikel in der grauen Substanz des Rückenmarks der Maus wurden Doppelimmunfluoreszenzmarkierungen mit Synaptotagmin 1 und Dynamin 1xb durchgeführt. In der weißen Substanz wurde im Gegensatz zur grauen Substanz ein viel geringeres Immunfluoreszenzsignal detektiert. Sowohl das synaptische Vesikelprotein Synaptotagmin 1 als auch Dynamin 1xb zeigten eine Anreicherung um den Nukleus von Neuronen in der grauen Substanz des Rückenmarks. Im Nukleus selber wurde keine Anreicherung detektiert.

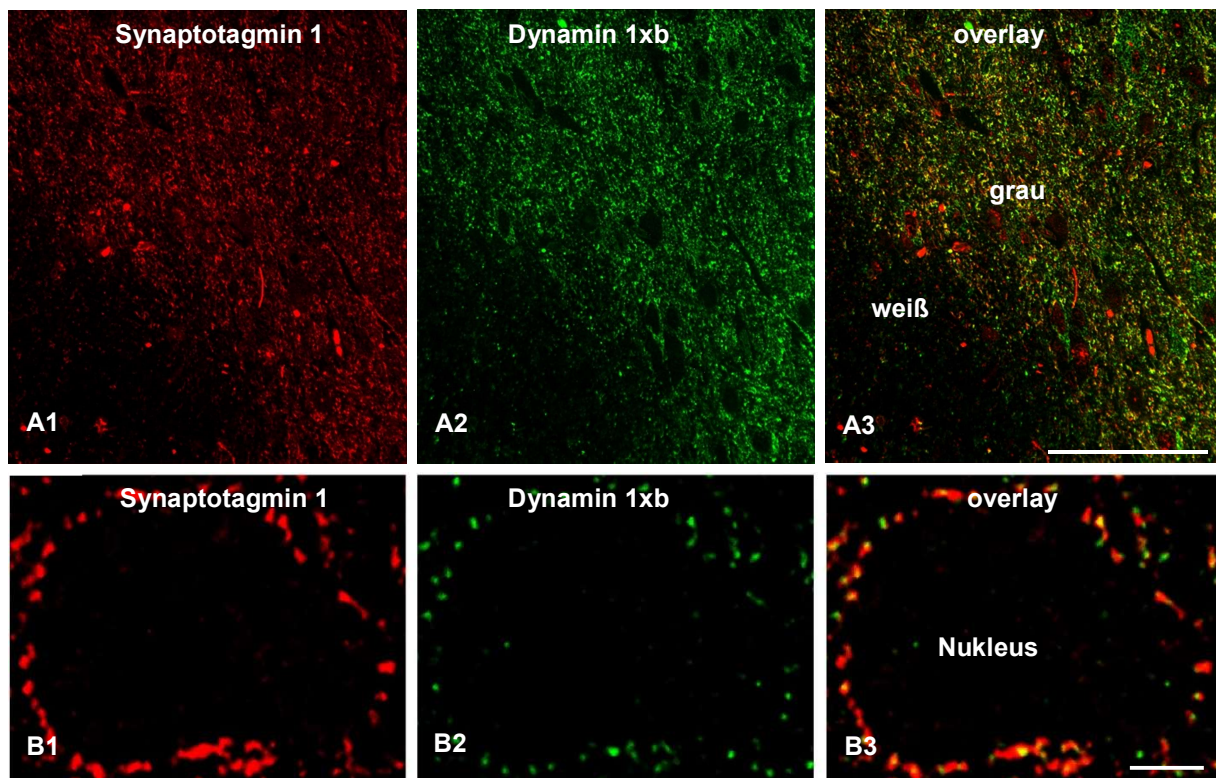


Abbildung 28. Synaptotagmin 1 und Dynamin1xb in der grauen und weißen Substanz des Rückenmarks der Maus

0,5µm dünne Schnitte des Mause Rückenmarks wurden mit Anti-Synaptotagmin 1 und Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) doppelt Immunfluoreszenz markiert. In der weißen Substanz (weiß) werden im Gegensatz zur grauen Substanz (grau) sowohl für Dynamin 1xb als auch für Synaptotagmin 1 nur geringe Immunfluoreszenzsignale detektiert (**A1-A3**). Um den Nukleus von Neuronen der grauen Substanz konnten die synaptischen Vesikel mittels Synaptotagmin 1 dargestellt werden (**B1**). Dynamin 1xb wurde ebenfalls um den Nukleus herum detektiert (**B2**). Maßbalken A1-13 = 50µm. Maßbalken B1-B3 = 10µm

3.3.4.3 Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Dynamin 1xb und β -Tubulin

Dynamin 1xb konnte, wie in Kapitel 3.2.4.1 und 3.2.4.2 beschrieben, in der grauen und zu viel geringeren Mengen in der weißen Substanz des Rückenmarks, und dort vor allem in den großen Axonen, nachgewiesen werden. β -Tubulin hingegen konnte als zytoskeletales Protein sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz gefunden werden. Durch Polymerisation von β -Tubulin und α -Tubulin zu Heterodimeren entstehen die Mikrotubuli. Diese bilden zusammen mit den Aktin- und den Intermediärfilamenten das Zytoskelett

eukaryotischer Zellen. Tubulin ist also sowohl im Soma, als auch im Axon eines Neurons exprimiert.

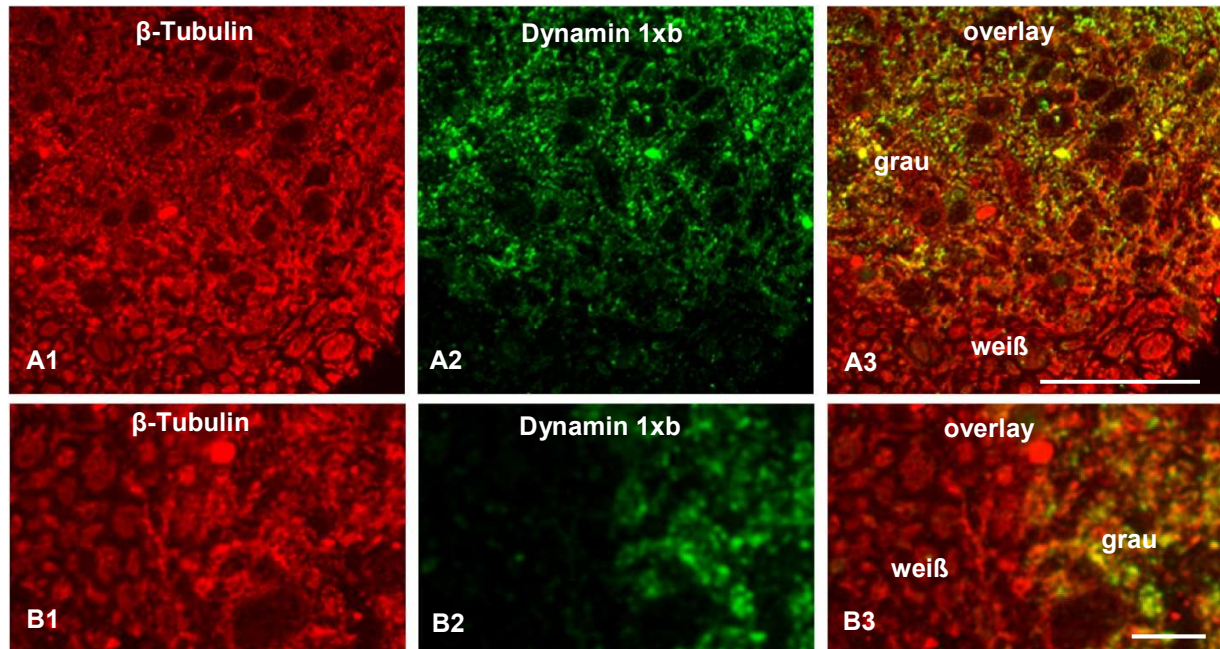


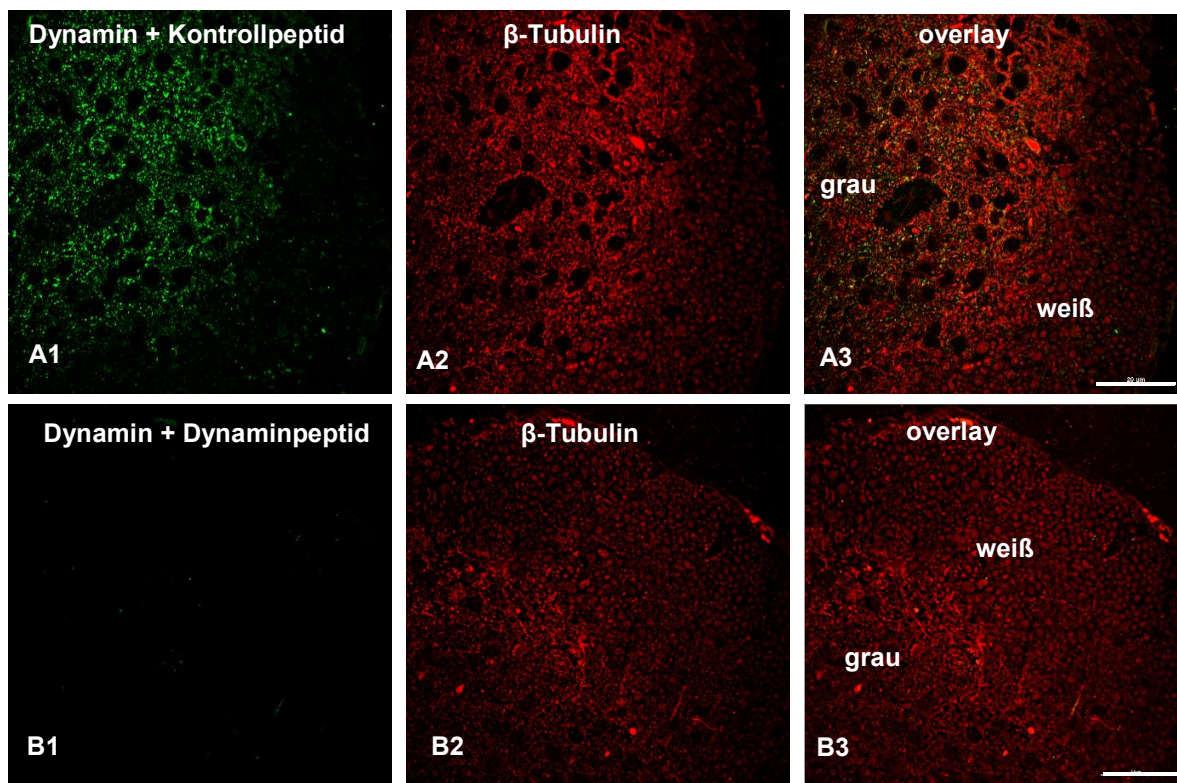
Abbildung 29. Verteilung von Dynamin 1xb und β -Tubulin in der grauen und weißen Substanz des Mause Rückenmarks

0,5µm dünne Schnitte Rückenmarks der Maus doppel-immunfluoreszenz-gefärbt mit dem polyklonalen Antikörper gegen β -Tubulin und dem monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1xb (Klon 1E10). Beide Proteine finden sich in der grauen Substanz angereichert, während Dynamin 1xb im Gegensatz zu β -Tubulin in der weißen Substanz nur schwach in den axonalen Fasertrakten zu finden ist. Abkürzungen: grau = graue Substanz; weiß= weiße Substanz. Maßstab: A1-A3: 50 µm, B1-B3: 10µm

3.3.4.4 Präabsorptionsexperimente zum Nachweis der Spezifität des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers im Rückenmark der Maus

Im Rückenmark der Maus wurden Präabsorptionsexperimente mit dem Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörper durchgeführt. Der genaue Prozedurablauf ist in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben. In den Blockierungsexperimenten wurde der Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörper vor Inkubation auf den Semidünnschnitten mit seinem spezifischen Peptid präabsorbiert, sodass keine Dynamin-spezifischen Immunsignale mehr detektiert werden

konnten (Abbildung 30 B und D). In den Kontrollexperimenten hingegen, in welchen mit einem irrelevanten Kontrollpeptid inkubiert wurde, zeigten sich die gleichen Immunfluoreszenzsignale für Dynamin wie in Kapitel 3.2.4.3 beschrieben (Abbildung 30 A und C). Dynamin war stark angereichert in der grauen, nicht aber in vergleichbarer Intensität in der weißen Substanz zu finden. Zur Gewebe- und Lokalisationskontrolle wurde in beiden Experimenten simultan mit dem polyklonalen Antikörper gegen β -Tubulin inkubiert. β -Tubulin zeigte auch hier sowohl eine Anreicherung in der grauen als auch in der weißen Substanz. Die Immunfluoreszenzsignale wurden im folgenden Kapitel mittels des Konfokalmikroskops AR1 der Firma Nikon (siehe Kapitel 2.2.1.5) aufgenommen.



(Legende auf der nächsten Seite)

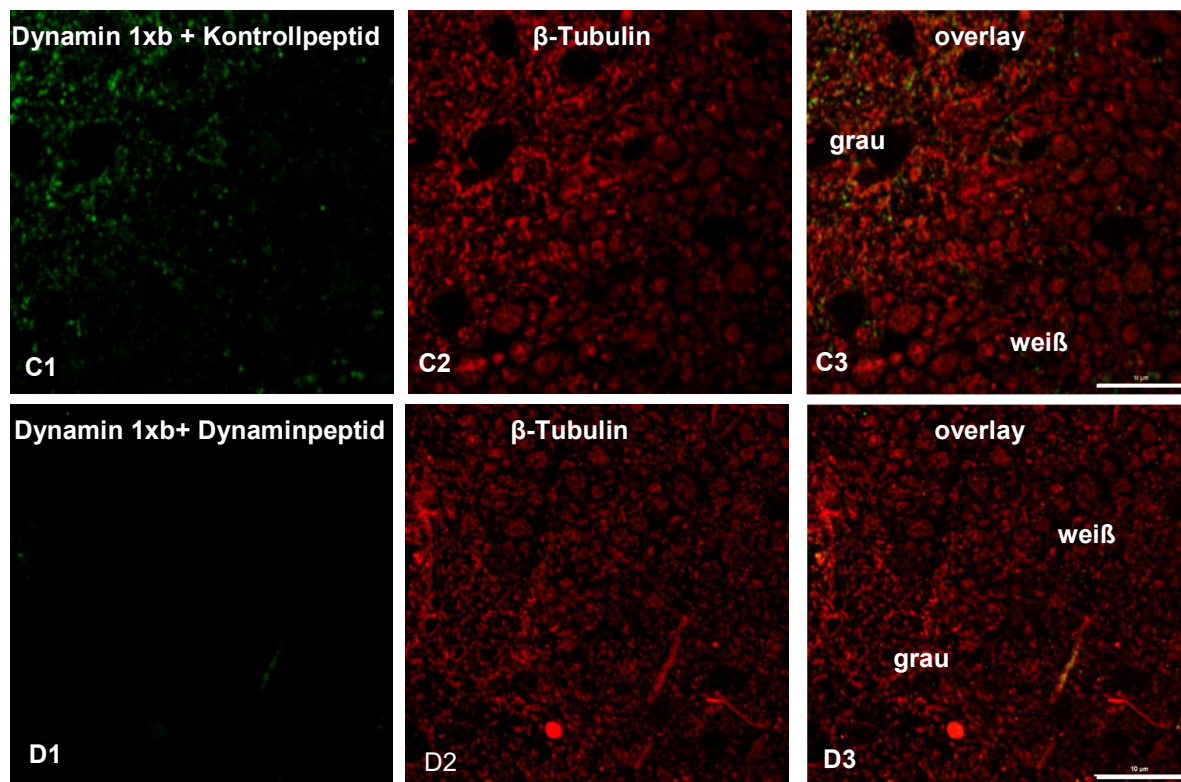


Abbildung 30 Präabsorptions- und Kontrollexperimente des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers im Rückenmark

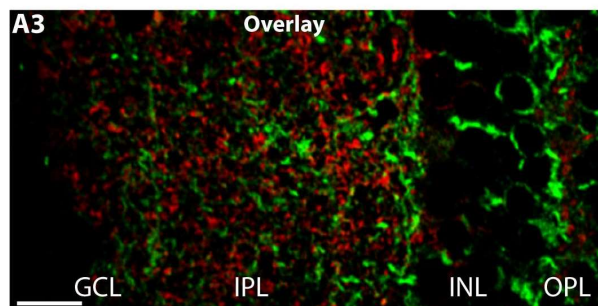
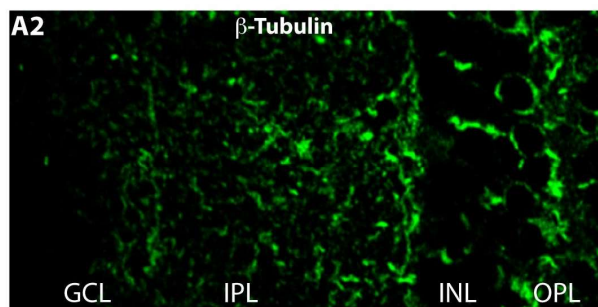
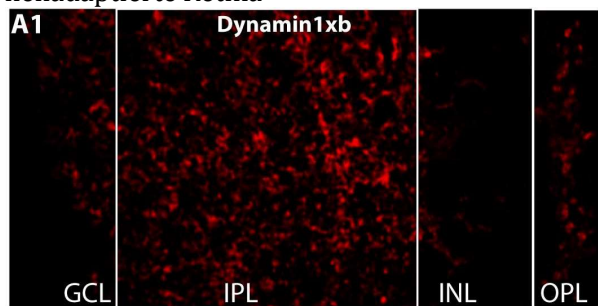
0,5µm dünne Schnitte Rückenmarks der Maus doppel-immunfluoreszenz-gefärbt mit dem polyklonalen Antikörper gegen β -Tubulin und dem monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1xb (Klon 1E10). Der Dynamin-Antikörper wurde vor seinem Einsatz entweder mit einem irrelevanten Kontrollpeptid (**A** und **C**) oder dem seinem spezifischen Dynaminpeptid (**B** und **D**) inkubiert. Das spezifische Peptid blockte das Dynaminsignal komplett (**B** und **D**), während das Kontrollpeptid keinen Einfluss auf die spezifischen Immunsignale des Anti-Dynamin 1xb Antikörpers hatte (**A** und **C**). Beide Proteine finden sich in der grauen Substanz angereichert, während Dynamin 1xb im Gegensatz zu β -Tubulin nur sehr schwach in den Fasertrakten der weißen Substanz zu finden ist. Abkürzungen: grau = graue Substanz; weiß= weiße Substanz. Maßstab: 20µm in A und B. 10 µm in C und D

3.3.5 Evaluation des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers in hell- und dunkeladaptierter Retina der Maus

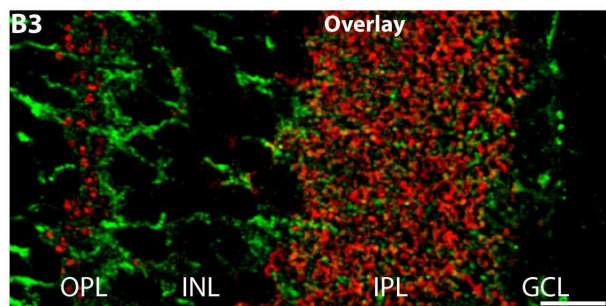
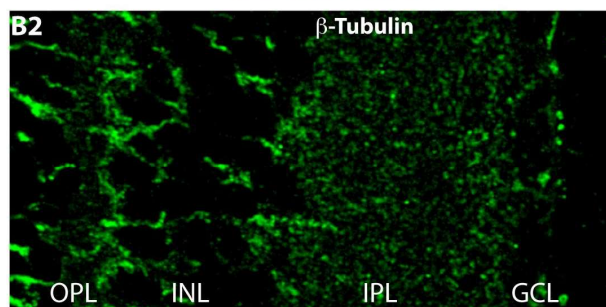
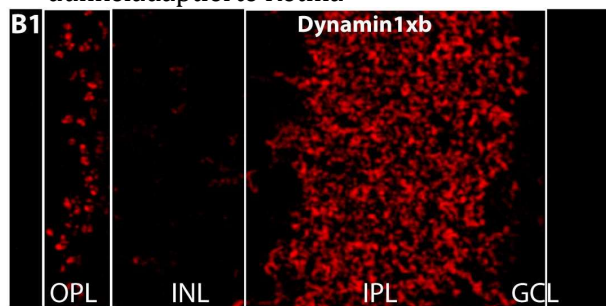
(Durchgeführt von Ekta Dembla)

Aufgrund der Tatsache, dass Dynamin 1xb eine Ca^{2+} -regulierte Splicevariante von Dynamin 1 ist, haben wir getestet, ob eine unterschiedliche Verteilung von Dynamin 1xb in Synapsen von hell- und dunkeladaptierter Retina vorliegt. Photorezeptorsynapsen in der äußeren Retina sind tonisch aktive Ribbonsynapsen mit einem besonders hohen basalen Vesikelumsatz in der Dunkelheit (Jackman et al. 2009). Aufgrund dessen wurden Immunfluoreszenzmarkierungen mit dem Anti-Dynamin 1xb Antikörper in Schnitten von hell- und dunkeladaptierter Retina durchgeführt. Co-Immunmarkierungen derselben Schnitte mit Antikörper gegen Tubulin dienten als Kontrollinkubationen, um z.B. eventuelle Unterschiede in der Dicke der Schnitte sichtbar zu machen. Die Verteilung von β -Tubulin ist den vorher publizierten Beobachtungen der Verteilung von Tubulin in der Retina sehr ähnlich (z.B. Grayson et al. 2002). Die Analyse von hell- und dunkeladaptierten Schnitten wurde unter exakt gleichen Analysebedingungen („Re-use settings“ am konfokalen Mikroskop, gleiche Bedingungen z.B. bzgl. Expositionszeiten) durchgeführt. Die Analysen wurden blind durchgeführt, d.h. ohne Kenntnis darüber, ob die Retina von einem hell- oder dunkeladaptierten Tier stammten. In den dunkeladaptierten Proben wurde ein erhöhtes Signal für Dynamin 1xb, vor allem in der OPL, nachgewiesen. Auch in der IPL konnte zu einem etwas geringeren Ausmaß ein erhöhtes Immunfluoreszenzsignal in den dunkeladaptierten Retinae im Vergleich zu den helladaptierten beobachtet werden. Das β -Tubulinsignal zeigte keine Unterschiede in der Intensität zwischen hell- und dunkeladaptierten Retinae. Dies ist ein Indiz dafür, dass die beobachteten Unterschiede in der Intensität der Dynamin 1xb-Signale nicht auf Variationen in der Schnittdicke oder eine globale Protein-Umverteilung zurückzuführen sind (Abbildung 31). Die Immunfluoreszenzsignale wurden mittels des Konfokalmikroskops der Firma Nikon aufgezeichnet (Abbildung 31 A und B).

helladaptierte Retina



dunkeladaptierte Retina



(Legende auf der nächsten Seite)

C)

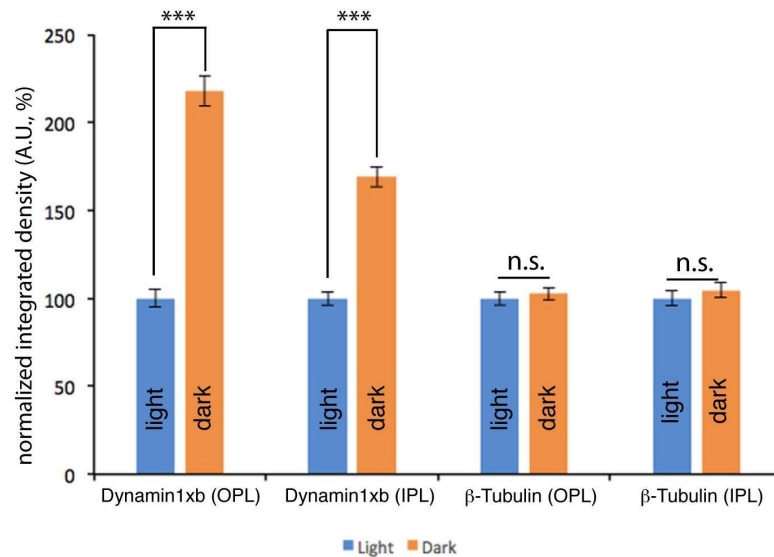


Abbildung 31. Quantifizierung synaptischer Dynamin 1xb Immunsignale in hell- und dunkeladaptierter Retina

Semidünnschnitte von hell- (A) und dunkeladaptierter (B) Retina doppelimmunfluoreszenz markiert mit dem monoklonalen Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörper (A1, 3; B1, 3) und dem polyklonalen Antikörper gegen β -Tubulin (A2, 3; B2, 3). Dynamin 1xb wurde in der OPL und IPL angereichert detektiert. Unter dunkeladaptierten Bedingungen konnte ein verstärktes Signal für Dynamin 1xb in den synaptischen Schichten OPL und IPL beobachtet werden, während das Signal für β -Tubulin unverändert blieb. Die von weißen Boxen umgebenen Bereiche markieren die Bereiche wie OPL und IPL, die für die Quantifizierung der Immunfluoreszenzsignale herangezogen wurden. C) Quantifizierung der Immunsignale in der OPL und IPL für Dynamin 1xb und β -Tubulin (normierte Daten). Die Quantifizierung der Immunfluoreszenzsignale (wie integrierte Dichte) wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (Wahl et al. 2016). N=3 für hell- und dunkeladaptierte Retinae; n=93 Bilder, die zur Analyse für hell- und dunkeladaptierte Retinae herangezogen wurden. A.U. = arbitrary units; OPL= outer plexiform layer; INL=inner nuclear layer; IPL= inner plexiform layer; GCL= ganglion cell layer. Messbalken: 20 μ m. Durchgeführt von Ekta Dembla.

4 Diskussion

In der vorliegenden Doktorarbeit habe ich den selbsthergestellten, monoklonalen Antikörper Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) charakterisiert. Dieser Antikörper ist gegen eine Sequenz in der Calcineurin-Bindungsdomäne (CPPGVPRITISDP) einer Splicevariante von Dynamin 1 gerichtet (Xue et al. 2011; Bodmer, Ascaño, und Kuruvilla 2011). Ich habe Dynamin 1xb in allen untersuchten Regionen des zentralen Nervensystems (ZNS) gefunden. Die Aufgaben, die Dynamin 1xb im ZNS in der synaptischen Maschinerie übernimmt, werden in allen Synapsenformen benötigt. Präsynaptische Terminalen der Synapsen im Gehirn weisen einen intensiven Vesikelverkehr auf, der essentiell für die synaptische Kommunikation ist (Südhof 2004; Fernández-Alfonso und Ryan 2006; Schweizer und Ryan 2006; Yamashita 2012; Soykan, Maritzen, und Haucke 2016). Sowohl exo- als auch endozytotische Signalwege tragen zu dieser Kommunikation bei. Neurotransmitter werden durch die Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran der Präterminale ausgeschüttet und in den synaptischen Spalt freigegeben. Nach der Exozytose werden die Vesikelkomponenten durch Endozytose wiederverwertet und stehen so einem neuen synaptischen Vesikel-Zyklus zur Verfügung (Südhof 2004; Schweizer und Ryan 2006; Wu, Ryan, und Lagnado 2007; Wu und Wu 2014; LoGiudice und Matthews 2007; Dittman und Ryan 2009; Yamashita 2012; Rizzoli und Betz 2005; Soykan, Maritzen, und Haucke 2016).

Von den drei Isoformen Dynamins ist Dynamin 1 essentiell für die aktivitätsabhängige Vesikel-Endozytose in der präsynaptischen Terminalen (Ferguson und De Camilli 2012; Ferguson et al. 2007; Cousin 2015; Kononenko und Haucke 2015; Soykan, Maritzen, und Haucke 2016). Generell gibt es die unterschiedlichsten Formen der Endozytose an der präsynaptischen Membran, die sich in funktionellen Eigenschaften, wie Kinetik, Ca^{2+} -Signale, Temperaturabhängigkeit und zugrundeliegenden molekularen Mechanismen unterscheiden (Ferguson et al. 2007; Wu, Ryan, und Lagnado 2007; Wu und Wu 2014; Yamashita 2012; Cousin 2015; Kononenko und Haucke 2015; Gross und von Gersdorff 2016; Soykan, Maritzen, und Haucke 2016). Diese Formen der Endozytose beinhalten schnelle oder

langsame Wiederaufnahme von individuellen Membranvesikeln sowie Bulk-Endozytose und werden durch unterschiedliche Stimuli aktiviert (Wu et al. 2014; Gross und von Gersdorff 2016). Dabei sind die meisten dieser Endozytoseformen, auch die vor kurzem entdeckte ultraschnelle Endozytose (Watanabe, Liu, et al. 2013; Watanabe, Rost, et al. 2013; Delvendahl et al. 2016; Soykan et al. 2017), von Dynamin 1 abhängig (Ferguson et al. 2007; Wu et al. 2014; Pelassa et al. 2014; Cousin 2015; Soykan, Maritzen, und Haucke 2016). Die Endozytose in der synaptischen Präterminalen scheint von der synaptischen Aktivität und von vorübergehend steigenden präsynaptischen Ca^{2+} -Spiegeln stimuliert zu sein (Ferguson et al. 2007; Hosoi, Holt, und Sakaba 2009; Wu et al. 2009; Wu und Wu 2014). Die Rolle der Ca^{2+} -Spiegel ist dabei noch nicht im Ganzen verstanden und wird derzeit kontrovers diskutiert (Hosoi, Holt, und Sakaba 2009; Wu und Wu 2014; Kononenko und Haucke 2015; Gross und von Gersdorff 2016; Wu et al. 2009). Vor allem die schnelle Endozytose scheint von steigenden Ca^{2+} -Spiegeln angekurbelt zu werden (Neves, Gomis, und Lagnado 2001; Hosoi, Holt, und Sakaba 2009; Wu et al. 2009; Yamashita 2012; Kononenko und Haucke 2015), während die langsame Form weniger von Ca^{2+} abhängig zu sein scheint bzw. sogar von Ca^{2+} inhibiert wird (Hosoi, Holt, und Sakaba 2009; Wu et al. 2009; Yamashita 2012).

Dynamin 1xb im Speziellen zeichnet sich dadurch aus, dass es in der Lage ist, direkt mit der Calcium- und Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin zu interagieren (Xue et al. 2011; Bodmer, Ascaño, und Kuruvilla 2011; Ferguson und De Camilli 2012). Die Dephosphorylierung von Dynamin durch Calcineurin scheint der entscheidende Auslöser für die aktivitätsabhängige Bulk-Endozytose (activity-dependent bulk endocytosis [ADBE]) zu sein (Clayton et al. 2009; Xue et al. 2011; Nguyen et al. 2012). Dynamin 1 ist somit ein entscheidender Regulator in der Steuerung der aktivitätsabhängigen Endozytose. Nguyen et al. (2012) konnten zeigen, dass die Vorbehandlung von Synapsen mit dem Dynamininhibitor Dynasore die Formierung von Recyclosomen (Endosomen-ähnlichen Kompartimenten) bei der Bulk-Endozytose verhindert. Die direkte Bindung von Dynamin 1xb an Calcineurin legt die Vermutung nahe, dass diese Splicevariante möglicherweise die entscheidende Dynaminform in der ADBE darstellt und eine wichtige Rolle in der Wiederaufnahme von synaptischen Vesikeln nach starker exozytotischer Aktivität spielt. Unabhängig von seinem Phosphorylierungszustand kann Dynamin 1 außerdem mit Amphiphysin interagieren und

so seine Rolle als Vesikelabschnürer in der Clathrin-abhängigen Endozytose ausüben (McMahon und Boucrot 2011; Clayton et al. 2009).

Unter Verwendung von Dotblotexperimenten wurde gezeigt, dass der hier verwendete Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörper sich gegen die letzten 7 Aminosäuren des carboxyterminalen Endes von Dynamin 1xb richtet. Dieser Antikörper ist hochspezifisch, da schon geringe Mengen von 7ng ausreichen, um ein deutliches Signal zu erzielen.

Mit Hilfe von Western Blot Experimenten konnte ich zeigen, dass sich Dynamin 1xb mit dem selbstgenerierten Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörper in Cerebellum, Neocortex, in der Retina und im Rückenmark nachweisen lässt. Die Spezifität dieser Ergebnisse wurde durch Präabsorptionsexperimente, in denen der Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörper vorher mit seinem spezifischen Peptid (CPPGVPRITISDP) inkubiert wurde, bestätigt. Hier zeigten sich keine Signale in den Western Blot Experimenten. In den Kontrollexperimenten, in denen ein irrelevantes Kontrollpeptid eingesetzt wurde, zeigten sich die zu erwartenden Proteinbanden bei 100 kDa. Bei 15 µg Proteinauftragung und gleicher Aktin-Beladung in den Western Blot Experimenten konnte ich Dynamin 1xb jedoch nicht in der Niere oder im Darm nachweisen. Dynamin 1 konnte von Soda et al. 2012 in immunisolierten Podozyten der Niere nachgewiesen werden. Außerdem wurde gezeigt, dass der Verlust von Dynamin in kombinierten Dynamin-1- und 2 -KO-Mäusen zu Proteinurie und Nierenversagen führt. In dieser Arbeit wurden allerdings Lysate aus der ganzen Niere verwendet. Dass in dieser Arbeit Dynamin 1xb nicht in der Niere gefunden werden konnte, liegt entweder daran, dass diese spezielle Splicevariante in der Niere nicht existiert, oder dass die Konzentrationen von Dynamin 1xb in den verwendeten Lysaten der Niere zu gering war, sodass sie unter die Nachweisgrenze der Western Blot Experimente fielen. Gleiches gilt für Dynamin 1xb im Darm.

Zur genauen Lokalisation von Dynamin 1xb in Retina, Cerebellum, visuellem Cortex und Rückenmark führte ich Immunfluoreszenzmarkierungen auf 0,5µm dünnen, plastikeingebetteten Schnitten durch. Die Spezifität der Immunsignale wurde durch Präabsorptionsexperimente sichergestellt.

Im Cerebellum, im visuellen Cortex und im Rückenmark konnte Dynamin 1xb in dieser Arbeit jeweils in der grauen Substanz nachgewiesen werden. Dynamin 1xb wurde außerdem in enger räumlicher Nähe der Proteine RIM1/2 gefunden. Bei RIM 1/2 handelt es sich um Proteine, die in der aktiven Zone von Synapsen lokalisiert sind und dort Calcium-abhängig in der Regulation der Exozytose beteiligt sind. Diese räumliche Nähe zwischen Proteinen der aktiven Zone und einem an der Endozytose beteiligtem Protein (Dynamin 1xb) kann möglicherweise ein Hinweis auf eine Kooperation von Exo- und Endozytose sein. Mit der Untersuchung der späten Form der Bulk Endozytose konnten Nguyen et al. (2012) Evidenz für diese Koppelung von Exo- und Bulk Endozytose erbringen.

In der Retina konnte ich Dynamin 1xb in hohen Konzentrationen im Stratum plexiforme externum (OPL) und im Stratum plexiforme internum (IPL) nachweisen. Eine ähnliche Verteilung konnte für Dynamin 1 durch Immunfluoreszenzexperimente mit einem gut charakterisierten monoklonalen Antikörper gegen Dynamin 1 (hudy) von (Wahl, Katiyar, und Schmitz 2013) zuvor gezeigt werden. Der Hudy-Antikörper richtet sich im Vergleich zum Klon 1E10-Antikörper gegen das Peptid SPDPFGPPPQVPSRPNR (Aminosäuren 822–838) in der Prolin-reichen, C-terminalen Region von Dynamin 1. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen im Gegensatz zu der Arbeit von (Wahl, Katiyar, und Schmitz 2013) nur den Anteil von Dynamin 1xb an den Dynamin 1 Signalen. Die Arbeitsgruppe um Prof. Schmitz konnte in dieser vorherigen Studie Calcineurin in großer räumlicher Nähe zu den synaptischen Ribbons nachweisen. Calcineurin übt dort Funktionen in der Kontrolle von Protein-Protein-Interaktionen im endozytotischen Netzwerk aus. In der Retina gibt es aufgrund von Hell- und Dunkeladaption und der damit verbundenen unterschiedlichen Signaltransduktion verschiedene Anforderungen an die Wiederverwertung von synaptischen Vesikeln. Ihre Hypothese, dass sich Dynamin 1xb in den Ribbonsynapsen der Photorezeptoren finden lässt, konnte mit der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Interessanterweise konnte ein verstärktes Immunsignal für Dynamin 1xb in den synaptischen Schichten von dunkeladaptierten Retinae (im Vergleich zu lichtadaptierten Retinae) beobachtet werden. Die Immunsignale für β -Tubulin, die als Referenz dienten, waren unter diesen Bedingungen unverändert. Diese hell/dunkel Unterschiede waren vor

allem in der äußeren plexiformen Schicht (OPL), in der sich die Photorezeptorsynapsen befinden, sehr ausgeprägt. In dieser Schicht übermitteln die Photorezeptorsynapsen Lichtstimuli zur weiteren Verarbeitung in die innere Retina. In der Dunkelheit besitzen die Photorezeptoren einen sehr hohen synaptischen Vesikelumsatz (Jackman et al., 2009) mit einem großen Bedarf an aktivitätsabhängiger Membranwiederverwertung. Aufgrund dessen kann man das verstärkte Immunsignal in der OPL mit einer aktivitätsabhängigen Rekrutierung und Anreicherung von Dynamin 1xb an den Photorezeptorsynapsen betrachten.

Überraschenderweise zeigte die innere plexiforme Schicht (IPL) der dunkeladaptierten Retinae ebenfalls ein stark verstärktes Immunsignal für Dynamin 1xb. Dieser Anstieg von Dynamin 1xb in der IPL war hoch signifikant und spezifisch; das Referenzprotein (β -Tubulin) zeigte keinen quantitativen Unterschied im Immunfluoreszenzsignal in den synaptischen Schichten der Retina zwischen Hell- und Dunkeladaptation. Die IPL beinhaltet eine gemischte Population an Synapsen, die entweder durch Licht aktiviert („ON“-Synapsen) oder durch Licht inaktiviert werden („OFF“-Synapsen) (Tian 2004; Lukasiewicz 2005; Euler et al. 2014; Behrens et al. 2016; Franke et al. 2017). Aufgrund dessen ist die Rekrutierung von Dynamin 1xb nicht ausschließlich durch eine aktivitätsinduzierte Rekrutierung der Synapse in der Dunkelheit erklärbar, sondern kann von einem zusätzlichen, dunkelheitsabhängigen Effekt überlagert sein. Das verstärkte Immunsignal in der OPL und IPL kann ebenfalls – zumindest teilweise – durch eine verstärkte Proteinbiosynthese von Dynamin 1xb innerhalb der 4,5 Stunden Dunkeladaptation hervorgerufen werden. Vorherige Studien zeigten keine offensichtlichen Unterschiede in der globalen Proteinbiosynthese in hell- und dunkeladaptierten Retinae (Ames, Parks, und Nesbett 1980; Hollyfield und Anderson 1982). Allerdings konnte in bestimmten Fällen eine Belichtungsabhängige Anreicherung von bestimmten Proteinen in retinalen Subkompartimenten beobachtet werden, die entweder durch Illuminationsabhängige Proteinsynthese (Iuvone und Besharse 1983; Hiragaki et al. 2014; Hughes et al. 2015; Wolloscheck et al. 2015; Vancura et al. 2016) oder durch den zirkadianen Rhythmus hervorgerufen wird (Tosini und Menaker 1996; Tosini et al. 2007; Wolloscheck et al. 2015; Vancura et al. 2016). Des Weiteren könnte die Licht-abhängige Translokation eine Rolle spielen. Die Licht-abhängige

subzelluläre Translokation ist bekannt für die Proteine der visuellen Transduktionskaskade in Photorezeptoren, wie z.B. Transducin, Arrestin und unc119a (Whelan und McGinnis 1988; Artemyev 2008; Kerov und Artemyev 2011; Majumder et al. 2013; Sinha et al. 2013). Es ist unwahrscheinlich, dass der zirkadiane Rhythmus eine große Rolle in den beobachteten Veränderungen der Dynamin 1xb-Expression spielt, da Hell- und Dunkeladaptation zur gleichen Zeit durchgeführt wurden.

Durch seine direkte Interaktionsmöglichkeit mit Calcineurin bietet Dynamin 1xb also die Möglichkeit zur direkten Dephosphorylierung durch Calcineurin und damit verbunden zur Triggerung der aktivitätsabhängigen Bulk-Endozytose. Anhand dieses Sachverhalts lässt sich mutmaßen, dass Dynamin 1xb, das als bisher einzige Splicevariante dieses Bindungsmotiv (PxIxIT) zur Interaktion mit Calcineurin aufweist, die entscheidende Isoform Dynamins in der ADBE ist (Xue et al. 2011; Bodmer, Ascaño, und Kuruvilla 2011). In der vorliegenden Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass Dynamin 1xb in den vier getesteten neuronalen Geweben der Maus exprimiert wird, während es in den zwei nicht neuronalen Geweben mit den hier angewandten Methoden nicht präsent ist. Außerdem brachte die Colokalisation von Dynamin 1xb mit synaptischen Vesikelproteinen SV2 und Synaptotagmin und den aktiven-Zone-Proteinen RIM 1/2 im Cerebellum, visuellen Cortex und Rückenmark die Evidenz, dass Dynamin 1xb an Stellen vermehrter synaptischer Vesikelaktivität zu finden ist. Gleiches konnte in der Retina durch die Colokalisation Dynamin 1xb mit dem synaptischen Ribbon-Protein RIBEYE festgestellt werden.

Weitere Studien werden genauer differenzieren müssen, inwieweit die Illuminationsabhängige Proteinbiosynthese und der zirkadiane Rhythmus für die Unterschiede in den Immunfluoreszenzsignalen für Dynamin 1xb in hell- und dunkeladaptierten Retinae verantwortlich sind. Für diese Experimente und für die weitere Charakterisierung von Dynamin 1 Splicevarianten, wie z.B. ob regionale Unterschiede in der Expression innerhalb verschiedener Synapsenformen vorliegen oder inwieweit diese Splicevariante noch andere Funktionen innerhalb der Zelle aufweist, kann der hier verwendete monoklonale Antikörper herangezogen werden.

5 Literaturverzeichnis

- Ames, Adelbert III., Joe. M. Parks, und Frances. B. Nesbett. 1980. „Synthesis and Degradation of Retinal Proteins in Darkness and during Photic Stimulation“. *Journal of Neurochemistry* 35 (1): 143–48.
- Andersson, Fredrik, Joel Jakobsson, Peter Löw, Oleg Shupliakov, und Lennart Brodin. 2008. „Perturbation of Syndapin/PACSIN Impairs Synaptic Vesicle Recycling Evoked by Intense Stimulation“. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (15): 3925–33. doi:10.1523/JNEUROSCI.1754-07.2008.
- Anggono, Victor, und Phillip J. Robinson. 2007. „Syndapin I and Endophilin I Bind Overlapping Proline-Rich Regions of Dynamin I: Role in Synaptic Vesicle Endocytosis“. *Journal of Neurochemistry* 102 (3): 931–43. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04574.x.
- Anggono, Victor, Karen J. Smillie, Mark E. Graham, Valentina A. Valova, Michael A. Cousin, und Phillip J. Robinson. 2006. „Syndapin I Is the Phosphorylation-Regulated Dynamin I Partner in Synaptic Vesicle Endocytosis“. *Nature Neuroscience* 9 (6): 752–60. doi:10.1038/nn1695.
- Anjum, Rizwana, Hires Ayoubian, und Frank Schmitz. 2014. „Differential synaptic distribution of the scaffold proteins Cask and Caskin1 in the bovine retina“. *Molecular and Cellular Neuroscience* 62 (September): 19–29. doi:10.1016/j.mcn.2014.08.004.
- Artemyev, Nikolai O. 2008. „Light-Dependent Compartmentalization of Transducin in Rod Photoreceptors“. *Molecular Neurobiology* 37 (1): 44–51. doi:10.1007/s12035-008-8015-2.
- Aumüller, Gerhard, Gabriela Aust, Jürgen Engele, Joachim Kirsch, Giovanni Maio, Artur Mayerhofer, Siegfried Mense, u. a. 2014. *Duale Reihe Anatomie*. 3. aktualisiert. Stuttgart: Thieme.
- Bacaj, Taulant, Dick Wu, Jacqueline Burré, Robert C. Malenka, Xinran Liu, und Thomas C. Südhof. 2015. „Synaptotagmin-1 and -7 Are Redundantly Essential for Maintaining the Capacity of the Readily-Releasable Pool of Synaptic Vesicles“. *PLoS Biology* 13 (10). doi:10.1371/journal.pbio.1002267.
- Bajjalieh, Sandra M., Karen Peterson, Michael Linial, und Richard H. Scheller. 1993. „Brain contains two forms of synaptic vesicle protein 2.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (6): 2150–54.
- Behrens, Christian, Timm Schubert, Silke Haverkamp, Thomas Euler, und Philipp Berens. 2016. „Connectivity Map of Bipolar Cells and Photoreceptors in the Mouse Retina“. *eLife* 5 (November). doi:10.7554/eLife.20041.
- Bitoun, Marc, Svetlana Maugenre, Pierre-Yves Jeannet, Emmanuelle Lacène, Xavier Ferrer, Pascal Laforêt, Jean-Jacques Martin, u. a. 2005. „Mutations in Dynamin 2 Cause Dominant Centronuclear Myopathy“. *Nature Genetics* 37 (11): 1207–9. doi:10.1038/ng1657.
- Bodmer, Daniel, Maria Ascaño, und Rejji Kuruvilla. 2011. „Isoform-Specific Dephosphorylation of Dynamin1 by Calcineurin Couples Neurotrophin Receptor

- Endocytosis to Axonal Growth". *Neuron* 70 (6): 1085–99. doi:10.1016/j.neuron.2011.04.025.
- Boucrot, Emmanuel, Saveez Saffarian, Rongying Zhang, und Tomas Kirchhausen. 2010. „Roles of AP-2 in Clathrin-Mediated Endocytosis". *PloS One* 5 (5): e10597. doi:10.1371/journal.pone.0010597.
- Buckley, Kathleen, und Regis B. Kelly. 1985. „Identification of a Transmembrane Glycoprotein Specific for Secretory Vesicles of Neural and Endocrine Cells". *The Journal of Cell Biology* 100 (4): 1284–94.
- Cao, Hong, Fabiana Garcia, und Mark A. McNiven. 1998. „Differential Distribution of Dynamin Isoforms in Mammalian Cells". *Molecular Biology of the Cell* 9 (9): 2595–2609.
- Catteruccia, Michela, Fabiana Fattori, Valentina Codemo, Lucia Ruggiero, Lorenzo Maggi, Giorgio Tasca, Chiara Fiorillo, u. a. 2013. „Centronuclear Myopathy Related to Dynamin 2 Mutations: Clinical, Morphological, Muscle Imaging and Genetic Features of an Italian Cohort". *Neuromuscular Disorders: NMD* 23 (3): 229–38. doi:10.1016/j.nmd.2012.12.009.
- Chalupa, Leo M. und Williams, Robert W.. 2008. *Eye, Retina, and Visual System of the Mouse*. Massachusetts Institute of Technology: MIT Press. http://cognet.mit.edu.proxy1.library.jhu.edu/system/cogfiles/books/9780262270137/pdfs/9780262270137_preface.pdf.
- Chidambaram, Subbulakshmi, Jana Zimmermann, und Gabriele Fischer von Mollard. 2008. „ENTH Domain Proteins Are Cargo Adaptors for Multiple SNARE Proteins at the TGN Endosome". *Journal of Cell Science* 121 (Pt 3): 329–38. doi:10.1242/jcs.012708.
- Christensen, Burgess N., und Edward R. Perl. 1970. „Spinal Neurons Specifically Excited by Noxious or Thermal Stimuli: Marginal Zone of the Dorsal Horn". *Journal of Neurophysiology* 33 (2): 293–307.
- Claeys, Kristl G., Stephan Züchner, Marina Kennerson, José Berciano, Antonio Garcia, Kristien Verhoeven, Elsdon Storey, u. a. 2009. „Phenotypic Spectrum of Dynamin 2 Mutations in Charcot-Marie-Tooth Neuropathy". *Brain: A Journal of Neurology* 132 (Pt 7): 1741–52. doi:10.1093/brain/awp115.
- Clayton, Emma L., Victor Anggono, Karen J. Smillie, Ngoc Chau, Phillip J. Robinson, und Michael A. Cousin. 2009. „The Phospho-Dependent Dynamin-Syndapin Interaction Triggers Activity-Dependent Bulk Endocytosis of Synaptic Vesicles". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (24): 7706–17. doi:10.1523/JNEUROSCI.1976-09.2009.
- Clayton, Emma L., und Michael A. Cousin. 2009. „The Molecular Physiology of Activity-Dependent Bulk Endocytosis of Synaptic Vesicles". *Journal of neurochemistry* 111 (4): 901–14. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06384.x.
- Clayton, Emma L., Gareth J. O. Evans, und Michael A. Cousin. 2008. „Bulk Synaptic Vesicle Endocytosis Is Rapidly Triggered during Strong Stimulation". *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 28 (26): 6627–32. doi:10.1523/JNEUROSCI.1445-08.2008.
- Clayton, Emma L., Nancy Sue, Karen J. Smillie, Timothy O’Leary, Nicolai Bache, Giselle Cheung, Adam R. Cole, u. a. 2010. „Dynamin I Phosphorylation by GSK3 Controls Activity-Dependent Bulk Endocytosis of Synaptic Vesicles". *Nature Neuroscience* 13 (7): 845–51. doi:10.1038/nn.2571.

- Cook, Tiffaby A., Raul Urrutia, und Mark A. McNiven. 1994. „Identification of Dynamin 2, an Isoform Ubiquitously Expressed in Rat Tissues“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (2): 644–48.
- Cousin, Mark A., und Phillip J. Robinson. 2001. „The Dephosphins: Dephosphorylation by Calcineurin Triggers Synaptic Vesicle Endocytosis“. *Trends in Neurosciences* 24 (11): 659–65.
- Cousin, Michael A. 2015. „Synaptic Vesicle Endocytosis and Endosomal Recycling in Central Nerve Terminals: Discrete Trafficking Routes?“ *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 21 (4): 413–23. doi:10.1177/1073858414542251.
- Cremona, Ottavio, und Pietro De Camilli. 1997. „Synaptic Vesicle Endocytosis“. *Current Opinion in Neurobiology* 7 (3): 323–30.
- DeFelipe, Javier, Lidia Alonso-Nanclares, und Jon I. Arellano. 2002. „Microstructure of the Neocortex: Comparative Aspects“. *Journal of Neurocytology* 31 (3–5): 299–316.
- Delvendahl, Igor, Nicholas P. Vyleta, Henrike von Gersdorff, und Stefan Hallermann. 2016. „Fast, Temperature-Sensitive and Clathrin-Independent Endocytosis at Central Synapses“. *Neuron* 90 (3): 492–98. doi:10.1016/j.neuron.2016.03.013.
- Dieckmann-Schuppert, A., und H. J. Schnittler. 1997. „A Simple Assay for Quantification of Protein in Tissue Sections, Cell Cultures, and Cell Homogenates, and of Protein Immobilized on Solid Surfaces“. *Cell and Tissue Research* 288 (1): 119–26.
- Diril, M. Kasim, Martin Wienisch, Nadja Jung, Jürgen Klingauf, und Volker Haucke. 2006. „Stonin 2 Is an AP-2-Dependent Endocytic Sorting Adaptor for Synaptotagmin Internalization and Recycling“. *Developmental Cell* 10 (2): 233–44. doi:10.1016/j.devcel.2005.12.011.
- Dittman, Jeremy, und Timothy A. Ryan. 2009. „Molecular Circuitry of Endocytosis at Nerve Terminals“. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25: 133–60. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113302.
- Doherty, Gary J., und Harvey T. McMahon. 2009. „Mechanisms of Endocytosis“. *Annual Review of Biochemistry* 78: 857–902. doi:10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540.
- Drenckhahn, Detlev, und Henning Franz. 1986. „Identification of Actin-, Alpha-Actinin-, and Vinculin-Containing Plaques at the Lateral Membrane of Epithelial Cells“. *The Journal of Cell Biology* 102 (5): 1843–52.
- Ellinger, Isabella, und Peter Pietschmann. 2016. „Endocytosis in Health and Disease—a Thematic Issue Dedicated to Renate Fuchs“. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 166 (7–8): 193–95.
- Escobar, M. I., H. Pimienta, V. S. Caviness, M. Jacobson, J. E. Crandall, und K. S. Kosik. 1986. „Architecture of Apical Dendrites in the Murine Neocortex: Dual Apical Dendritic Systems“. *Neuroscience* 17 (4): 975–89.
- Euler, Thomas, Silke Haverkamp, Timm Schubert, und Tom Baden. 2014. „Retinal Bipolar Cells: Elementary Building Blocks of Vision“. *Nature Reviews. Neuroscience* 15 (8): 507–19.
- Faelber, Katja, York Posor, Song Gao, Martin Held, Yvette Roske, Dennis Schulze, Volker Haucke, Frank Noé, und Oliver Daumke. 2011. „Crystal Structure of Nucleotide-Free Dynamin“. *Nature* 477 (7366): 556–60. doi:10.1038/nature10369.

- Ferguson, Shawn M., Gabor Brasnjo, Mitsuko Hayashi, Markus Wölfel, Chiara Collesi, Silvia Giovedi, Andrea Raimondi, u. a. 2007. „A Selective Activity-Dependent Requirement for Dynamin 1 in Synaptic Vesicle Endocytosis“. *Science (New York, N.Y.)* 316 (5824): 570–74. doi:10.1126/science.1140621.
- Ferguson, Shawn M., und Pietro De Camilli. 2012. „Dynamin, a membrane-remodelling GTPase“. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Januar. doi:10.1038/nrm3266.
- Ferguson, Shawn M., Andrea Raimondi, Summer Paradise, Hongying Shen, Kumi Mesaki, Agnes Ferguson, Olivier Destaing, u. a. 2009. „Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits“. *Developmental cell* 17 (6): 811–22. doi:10.1016/j.devcel.2009.11.005.
- Fernández-Alfonso, Tomás, und Timothy A. Ryan. 2006. „The Efficiency of the Synaptic Vesicle Cycle at Central Nervous System Synapses“. *Trends in Cell Biology* 16 (8): 413–20. doi:10.1016/j.tcb.2006.06.007.
- Fotin, Alexander, Yifan Cheng, Nikolaus Grigorieff, Thomas Walz, Stephen C. Harrison, und Tomas Kirchhausen. 2004. „Structure of an Auxilin-Bound Clathrin Coat and Its Implications for the Mechanism of Uncoating“. *Nature* 432 (7017): 649–53. doi:10.1038/nature03078.
- Franke, Katrin, Philipp Berens, Timm Schubert, Matthias Bethge, Thomas Euler, und Tom Baden. 2017. „Inhibition Decorrelates Visual Feature Representations in the Inner Retina“. *Nature* 542 (7642): 439–44. doi:10.1038/nature21394.
- Gimigliano, Anna, Linda Mannini, Laura Bianchi, Michele Puglia, Matthew A. Deardorff, Stefania Menga, Ian D. Krantz, Antonio Musio, und Luca Bini. 2012. „Proteomic Profile Identifies Dysregulated Pathways in Cornelia de Lange Syndrome Cells with Distinct Mutations in SMC1A and SMC3 Genes“. *Journal of Proteome Research* 11 (12): 6111–23. doi:10.1021/pr300760p.
- Gold, Elizabeth S., David M. Underhill, Naomi S. Morrisette, Jian Guo, Mark A. McNiven, und Alan Aderem. 1999. „Dynamin 2 Is Required for Phagocytosis in Macrophages“. *The Journal of Experimental Medicine* 190 (12): 1849–56.
- Grabner, Chad P., Maria A. Gandini, Renata Rehak, Yun Le, Gerald W. Zamponi, und Frank Schmitz. 2015. „RIM1/2-Mediated Facilitation of Cav1.4 Channel Opening Is Required for Ca²⁺-Stimulated Release in Mouse Rod Photoreceptors“. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35 (38): 13133–47. doi:10.1523/JNEUROSCI.0658-15.2015.
- Grabs, Detlev, Vladimir I. Slepnev, Zhou Songyang, Carol David, Mary Lynch, Lewis C. Cantley, und Pietro De Camilli. 1997. „The SH3 Domain of Amphiphysin Binds the Proline-Rich Domain of Dynamin at a Single Site That Defines a New SH3 Binding Consensus Sequence“. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (20): 13419–25.
- Graham, Mark E., Victor Anggono, Nicolai Bache, Martin R. Larsen, George E. Craft, und Phillip J. Robinson. 2007. „The in Vivo Phosphorylation Sites of Rat Brain Dynamin I“. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (20): 14695–707. doi:10.1074/jbc.M609713200.
- Grayson, Celene, Francesca Bartolini, J. Paul Chapple, Keith R. Willison, Arunashree Bhamidipati, Sally A. Lewis, Philip J. Luthert, Alison J. Hardcastle, Nicholas J. Cowan, und Michael E. Cheetham. 2002. „Localization in the Human Retina of the X-Linked Retinitis Pigmentosa Protein RP2, Its Homologue Cofactor C and the RP2 Interacting Protein Arl3“. *Human Molecular Genetics* 11 (24): 3065–74.

- Gross, Owen P., und Henrique von Gersdorff. 2016. „Recycling at Synapses“. *ELife* 5 (Juni). doi:10.7554/eLife.17692.
- Haucke, Volker, Markus R. Wenk, Edwin R. Chapman, Khashayar Farsad, und Pietro De Camilli. 2000. „Dual interaction of synaptotagmin with μ 2- and α -adaptin facilitates clathrin-coated pit nucleation“. *The EMBO Journal* 19 (22): 6011–19. doi:10.1093/emboj/19.22.6011.
- Haverkamp, Silke, und Heinz Wässle. 2000. „Immunocytochemical Analysis of the Mouse Retina“. *The Journal of Comparative Neurology* 424 (1): 1–23.
- Heinzel, W., A. Vogt, E. Kallee, und W. Faller. 1965. „A NEW METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTIBODY AND ANTIGEN PROTEIN, WITH A SENSITIVITY TO FIVE MICROGRAMS“. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 66 (August): 334–43.
- Henley, John R., Eugene W. Krueger, Barbara J. Oswald, und Mark A. McNiven. 1998. „Dynamamin-Mediated Internalization of Caveolae“. *The Journal of Cell Biology* 141 (1): 85–99.
- Henley, John R., und Mark A. McNiven. 1996. „Association of a Dynamamin-like Protein with the Golgi Apparatus in Mammalian Cells“. *The Journal of Cell Biology* 133 (4): 761–75.
- Henne, William Mike, Emmanuel Boucrot, Michael Meinecke, Emma Evergren, Yvonne Vallis, Rohit Mittal, und Harvey T. McMahon. 2010. „FCHo Proteins Are Nucleators of Clathrin-Mediated Endocytosis“. *Science (New York, N.Y.)* 328 (5983): 1281–84. doi:10.1126/science.1188462.
- Heymann, Jürgen A. W., und Jenny E. Hinshaw. 2009. „Dynamamins at a Glance“. *Journal of Cell Science* 122 (19): 3427–31. doi:10.1242/jcs.051714.
- Hinshaw, Jenny E., und Sandra L. Schmid. 1995. „Dynamamin Self-Assembles into Rings Suggesting a Mechanism for Coated Vesicle Budding“. *Nature* 374 (6518): 190–92. doi:10.1038/374190a0.
- Hiragaki, Susumu, Kenkichi Baba, Elise Coulson, Stefanie Kunst, Rainer Spessert, und Gianluca Tosini. 2014. „Melatonin Signaling Modulates Clock Genes Expression in the Mouse Retina“. *PLoS One* 9 (9): e106819. doi:10.1371/journal.pone.0106819.
- Hollyfield, Joe G., und Robert E. Anderson. 1982. „Retinal Protein Synthesis in Relationship to Environmental Lighting“. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 23 (5): 631–39.
- Höning, Stefan, Doris Ricotta, Michael Krauss, Kira Späte, Barbara Spolaore, Alison Motley, Margaret Robinson, Carol Robinson, Volker Haucke, und David J. Owen. 2005. „Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphate Regulates Sorting Signal Recognition by the Clathrin-Associated Adaptor Complex AP2“. *Molecular Cell* 18 (5): 519–31. doi:10.1016/j.molcel.2005.04.019.
- Hosoi, Nobutake, Matthew Holt, und Takeshi Sakaba. 2009. „Calcium Dependence of Exo- and Endocytotic Coupling at a Glutamatergic Synapse“. *Neuron* 63 (2): 216–29. doi:10.1016/j.neuron.2009.06.010.
- Hughes, Steven, Aarti Jagannath, Mark W. Hankins, Russell G. Foster, und Stuart N. Peirson. 2015. „Photoc Regulation of Clock Systems“. *Methods in Enzymology* 552: 125–43. doi:10.1016/bs.mie.2014.10.018.

- Iuvone, P. Michael und Joseph C. Besharse. 1983. „Regulation of Indoleamine N-Acetyltransferase Activity in the Retina: Effects of Light and Dark, Protein Synthesis Inhibitors and Cyclic Nucleotide Analogs“. *Brain Research* 273 (1): 111–19.
- Jackman, Skyler L., Sue-Yeon Choi, Wallace B. Thoreson, Katalin Rabl, Theodore M. Bartoletti, und Richard H. Kramer. 2009. „Role of the Synaptic Ribbon in Transmitting the Cone Light Response“. *Nature Neuroscience* 12 (3): 303–10. doi:10.1038/nn.2267.
- Johnston, Patricia A., Reinhard Jahn, und Thomas C. Südhof. 1989. „Transmembrane Topography and Evolutionary Conservation of Synaptophysin“. *The Journal of Biological Chemistry* 264 (2): 1268–73.
- Jones, Steven M., Kathryn E. Howell, John R. Henley, Hong Cao, und Mark A. McNiven. 1998. „Role of Dynamin in the Formation of Transport Vesicles from the Trans-Golgi Network“. *Science (New York, N.Y.)* 279 (5350): 573–77.
- Keen, James H. 1987. „Clathrin Assembly Proteins: Affinity Purification and a Model for Coat Assembly“. *The Journal of Cell Biology* 105 (5): 1989–98.
- Kerov, Vasily, und Nikolai O. Artemyev. 2011. „Diffusion and Light-Dependent Compartmentalization of Transducin“. *Molecular and Cellular Neurosciences* 46 (1): 340–46. doi:10.1016/j.mcn.2010.10.006.
- Kirchhausen, Tom, David Owen, und Stephen C. Harrison. 2014. „Molecular Structure, Function, and Dynamics of Clathrin-Mediated Membrane Traffic“. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (5): a016725. doi:10.1101/cshperspect.a016725.
- Kirkcaldie, Matthew T. K. 2012. „Chapter 4 - Neocortex A2 - Puelles, Charles WatsonGeorge PaxinosLuis“. In *The Mouse Nervous System*, 52–111. San Diego: Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123694973100044>.
- Kononenko, Natalia L., und Volker Haucke. 2015. „Molecular Mechanisms of Presynaptic Membrane Retrieval and Synaptic Vesicle Reformation“. *Neuron* 85 (3): 484–96. doi:10.1016/j.neuron.2014.12.016.
- Krueger, Eugene W., James D. Orth, Hong Cao, und Mark A. McNiven. 2003. „A Dynamin-Cortactin-Arp2/3 Complex Mediates Actin Reorganization in Growth Factor-stimulated Cells“. *Molecular Biology of the Cell* 14 (3): 1085–96. doi:10.1091/mbc.E02-08-0466.
- Laemey, Protti, Dreher. 2008. „Eye, Retina, and Visual System of the Mouse: chap3 - Comparative Survey of the Mammalian Visual System with Reference to the Mouse“. http://cognet.mit.edu.proxy1.library.jhu.edu/system/cogfiles/books/9780262270137/pdfs/9780262270137_chap3.pdf.
- Lamaze, Christophe Annick Dujancourt, Takeshi Baba, Charles G. Lo, Alexandre Benmerah, und Alice Dautry-Varsat. 2001. „Interleukin 2 Receptors and Detergent-Resistant Membrane Domains Define a Clathrin-Independent Endocytic Pathway“. *Molecular Cell* 7 (3): 661–71.
- Le Roy, Christine, und Jeffrey L. Wrana. 2005. „Clathrin- and Non-Clathrin-Mediated Endocytic Regulation of Cell Signalling“. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6 (2): 112–26. doi:10.1038/nrm1571.
- Lewis Carl, Stephanie A., Illona Gillete-Ferguson, und Donald G. Ferguson. 1993. „An Indirect Immunofluorescence Procedure for Staining the Same Cryosection with Two Mouse Monoclonal Primary Antibodies“. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*:

- Official Journal of the Histochemistry Society* 41 (8): 1273–78. doi:10.1177/41.8.7687266.
- Liu, Ya-Wen, Mark C. Surka, Thomas Schroeter, Vasyl Lukiyanchuk, und Sandra L. Schmid. 2008. „Isoform and Splice-Variant Specific Functions of Dynamin-2 Revealed by Analysis of Conditional Knock-Out Cells“. *Molecular Biology of the Cell* 19 (12): 5347–59. doi:10.1091/mbc.E08-08-0890.
- Llorente, Alicia, Andrzej Rapak, Sandra L. Schmid, Bo van Deurs, und Kirsten Sandvig. 1998. „Expression of Mutant Dynamin Inhibits Toxicity and Transport of Endocytosed Ricin to the Golgi Apparatus“. *The Journal of Cell Biology* 140 (3): 553–63.
- LoGiudice, Lisamarie, und Gary Matthews. 2007. „Endocytosis at Ribbon Synapses“. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8 (9): 1123–28. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00591.x.
- Lukasiewicz, Peter D. 2005. „Synaptic Mechanisms That Shape Visual Signaling at the Inner Retina“. *Progress in Brain Research* 147: 205–18. doi:10.1016/S0079-6123(04)47016-2.
- Lundmark, Richard, und Sven R. Carlsson. 2004. „Regulated Membrane Recruitment of Dynamin-2 Mediated by Sorting Nexin 9“. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (41): 42694–702. doi:10.1074/jbc.M407430200.
- Macia, Eric, Marcelo Ehrlich, Ramiro Massol, Emmanuel Boucrot, Christian Brunner, und Tomas Kirchhausen. 2006. „Dynasore, a Cell-Permeable Inhibitor of Dynamin“. *Developmental Cell* 10 (6): 839–50. doi:10.1016/j.devcel.2006.04.002.
- Majumder, Anurima, Johan Pahlberg, Kimberly K. Boyd, Vasily Kerov, Saravanan Kolandaivelu, Visvanathan Ramamurthy, Alapakkam P. Sampath, und Nikolai O. Artemyev. 2013. „Transducin Translocation Contributes to Rod Survival and Enhances Synaptic Transmission from Rods to Rod Bipolar Cells“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (30): 12468–73. doi:10.1073/pnas.1222666110.
- Mayor, Satyajit, und Richard E. Pagano. 2007. „Pathways of Clathrin-Independent Endocytosis“. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (8): 603–12. doi:10.1038/nrm2216.
- McMahon, Harvey T., und Emmanuel Boucrot. 2011. „Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis“. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (8): 517–33. doi:10.1038/nrm3151.
- McNiven, Mark A, Hong Cao, Kelly R Pitts, und Yisang Yoon. 2000. „The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places“. *Trends in Biochemical Sciences* 25 (3): 115–20. doi:10.1016/S0968-0004(99)01538-8.
- Mitchell, Bartley D., und Jeffrey D. Macklis. 2005. „Large-Scale Maintenance of Dual Projections by Callosal and Frontal Cortical Projection Neurons in Adult Mice“. *The Journal of Comparative Neurology* 482 (1): 17–32. doi:10.1002/cne.20428.
- Muhlberg, Amy B., Dale E. Warnock, und Sandra L. Schmid. 1997. „Domain Structure and Intramolecular Regulation of Dynamin GTPase“. *The EMBO Journal* 16 (22): 6676–83. doi:10.1093/emboj/16.22.6676.
- Nakata, Takao, Aikichi Iwamoto, Yasuko Noda, Reiko Takemura, Hiroshi Yoshikura, und Nobutaka Hirokawa. 1991. „Predominant and Developmentally Regulated Expression of Dynamin in Neurons“. *Neuron* 7 (3): 461–69.

- Neves, Guilherme, Ana Gomis, und Leon Lagnado. 2001. „Calcium Influx Selects the Fast Mode of Endocytosis in the Synaptic Terminal of Retinal Bipolar Cells“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (26): 15282–87. doi:10.1073/pnas.261311698.
- Newton, A. Jamila, Tom Kirchhausen, und Venkatesh N. Murthy. 2006. „Inhibition of Dynamin Completely Blocks Compensatory Synaptic Vesicle Endocytosis“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (47): 17955–60. doi:10.1073/pnas.0606212103.
- Nguyen, Tam H., Guillaume Maucourt, Robert K. P. Sullivan, Mitja Schenning, Nickolas A. Lavidis, Adam McCluskey, Phillip J. Robinson, und Frederic A. Meunier. 2012. „Actin- and Dynamin-Dependent Maturation of Bulk Endocytosis Restores Neurotransmission Following Synaptic Depletion“. *PloS One* 7 (5): e36913. doi:10.1371/journal.pone.0036913.
- Noack, Rebecca, Svenja Frede, Philipp Albrecht, Nadine Henke, Annika Pfeiffer, Katrin Knoll, Thomas Dehmel, u. a. 2012. „Charcot–Marie–Tooth Disease CMT4A: GDAP1 Increases Cellular Glutathione and the Mitochondrial Membrane Potential“. *Human Molecular Genetics* 21 (1): 150–62. doi:10.1093/hmg/ddr450.
- Ohno, Hiroshi, Jay Stewart, arie-Christine Fournier, Herbert Bosshart, Ina Rhee, Shoichiro Miyatake, Takashi Saito, Andreas Gallusser, Tomas Kirchhausen, und Juan S. Bonifacino. 1995. „Interaction of Tyrosine-Based Sorting Signals with Clathrin-Associated Proteins“. *Science (New York, N.Y.)* 269 (5232): 1872–75.
- Pang, Zhiping P., Ok-Ho Shin, Alexander C. Meyer, Christian Rosenmund, und Thomas C. Südhof. 2006. „A Gain-of-Function Mutation in Synaptotagmin-1 Reveals a Critical Role of Ca^{2+} -Dependent Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptor Complex Binding in Synaptic Exocytosis“. *The Journal of Neuroscience* 26 (48): 12556–65. doi:10.1523/JNEUROSCI.3804-06.2006.
- Parkar, Nihal S., Belinda S. Akpa, Ludwig C. Nitsche, Lewis E. Wedgewood, Aaron T. Place, Maria S. Sverdllov, Oleg Chaga, und Richard D. Minshall. 2009. „Vesicle Formation and Endocytosis: Function, Machinery, Mechanisms, and Modeling“. *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (6): 1301–12. doi:10.1089/ars.2008.2397.
- Patterson, Edward E., Katie M. Minor, Anna V. Tchernatynskaia, Susan M. Taylor, G. Diane Shelton, Kari J. Ekenstedt, und James R. Mickelson. 2008. „A Canine DNM1 Mutation Is Highly Associated with the Syndrome of Exercise-Induced Collapse“. *Nature Genetics* 40 (10): 1235–39. doi:10.1038/ng.224.
- Pelassa, Ilaria, Congjian Zhao, Mathias Pasche, Benjamin Odermatt, und Leon Lagnado. 2014. „Synaptic vesicles are “primed” for fast clathrin-mediated endocytosis at the ribbon synapse“. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7 (Dezember). doi:10.3389/fnmol.2014.00091.
- Perin, Mark S., Victor A. Fried, Gregory A. Mignery, Reinhard Jahn, und Thomas C. Südhof. 1990. „Phospholipid Binding by a Synaptic Vesicle Protein Homologous to the Regulatory Region of Protein Kinase C“. *Nature* 345 (6272): 260–63. doi:10.1038/345260a0.
- Petersen, Gary R., und James L. Van Etten. 1983. „Detection of Endoproteinasen in Polyacrylamide Gels“. *ELECTROPHORESIS* 4 (6): 433–35. doi:10.1002/elps.1150040613.

- Praefcke, Gerrit J. K., und Harvey T. McMahon. 2004. „The Dynamin Superfamily: Universal Membrane Tubulation and Fission Molecules?“ *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 (2): 133–47. doi:10.1038/nrm1313.
- Preta, Giulio, James G Cronin, und I Martin Sheldon. 2015. „Dynasore - not just a dynamin inhibitor“. *Cell Communication and Signaling : CCS* 13 (April). doi:10.1186/s12964-015-0102-1.
- Punge, Annedore, Silvio O. Rizzoli, Reinhard Jahn, Jan Dominik Wildanger, Lars Meyer, Andreas Schönle, Lars Kastrup, und Stefan W. Hell. 2008. „3D Reconstruction of High-Resolution STED Microscope Images“. *Microscopy Research and Technique* 71 (9): 644–50. doi:10.1002/jemt.20602.
- Raimondi, Andrea, Shawn M. Ferguson, Xuelin Lou, Moritz Armbruster, Summer Paradise, Silvia Giovedi, Mirko Messa, u. a. 2011. „Overlapping Role of Dynamin Isoforms in Synaptic Vesicle Endocytosis“. *Neuron* 70 (6): 1100–1114. doi:10.1016/j.neuron.2011.04.031.
- Ramachandran, Rajesh, Mark Surka, Joshua S. Chappie, Douglas M. Fowler, Ted R. Foss, Byeong Doo Song, und Sandra L. Schmid. 2007. „The Dynamin Middle Domain Is Critical for Tetramerization and Higher-Order Self-Assembly“. *The EMBO Journal* 26 (2): 559–66. doi:10.1038/sj.emboj.7601491.
- Reider, Amanda, Sarah L Barker, Sanjay K Mishra, Young Jun Im, Lymarie Maldonado-Báez, James H Hurley, Linton M Traub, und Beverly Wendland. 2009. „Syp1 is a conserved endocytic adaptor that contains domains involved in cargo selection and membrane tubulation“. *The EMBO Journal* 28 (20): 3103–16. doi:10.1038/emboj.2009.248.
- Rizzoli, Silvio O., und William J. Betz. 2005. „Synaptic Vesicle Pools“. *Nature Reviews. Neuroscience* 6 (1): 57–69. doi:10.1038/nrn1583.
- Royle, Stephen J., und Leon Lagnado. 2003. „Endocytosis at the Synaptic Terminal“. *The Journal of Physiology* 553 (Pt 2): 345–55. doi:10.1113/jphysiol.2003.049221.
- Saffarian, Saveez, Emanuele Cocucci, und Tomas Kirchhausen. 2009. „Distinct Dynamics of Endocytic Clathrin-Coated Pits and Coated Plaques“. *PLoS Biology* 7 (9). doi:10.1371/journal.pbio.1000191.
- Sauls, Kimberly, Katelynn Toomer, Katherine Williams, Amanda J. Johnson, Roger R. Markwald, Zoltan Hajdu, und Russell A. Norris. 2015. „Increased Infiltration of Extra-Cardiac Cells in Myxomatous Valve Disease“. *Journal of cardiovascular development and disease* 2 (3): 200–213. doi:10.3390/jcdd2030200.
- Schlossman, David M., Sandra L. Schmid, William A. Braell, und James E. Rothman. 1984. „An Enzyme That Removes Clathrin Coats: Purification of an Uncoating ATPase“. *The Journal of Cell Biology* 99 (2): 723–33.
- Schmid, Eva M, Marijn G. J Ford, Anne Burtey, Gerrit J. K Praefcke, Sew-Yeu Peak-Chew, Ian G Mills, Alexandre Benmerah, und Harvey T McMahon. 2006. „Role of the AP2 β -Appendage Hub in Recruiting Partners for Clathrin-Coated Vesicle Assembly“. *PLoS Biology* 4 (9). doi:10.1371/journal.pbio.0040262.
- Schmid, Sandra L., und Vadim A. Frolov. 2011. „Dynamin: Functional Design of a Membrane Fission Catalyst“. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27: 79–105. doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104016.
- Schmitz, Frank, Andreas Königstorfer, und Thomas C. Südhof. 2000. „RIBEYE, a Component of Synaptic Ribbons: A Protein's Journey through Evolution Provides Insight into

- Synaptic Ribbon Function". *Neuron* 28 (3): 857–72. doi:10.1016/S0896-6273(00)00159-8.
- Schoch, Susanne, Tobias Mittelstaedt, Pascal S Kaeser, Daniel Padgett, Nicole Feldmann, Vivien Chevaleyre, Pablo E Castillo, u. a. 2006. „Redundant functions of RIM1 α and RIM2 α in Ca²⁺-triggered neurotransmitter release". *The EMBO Journal* 25 (24): 5852–63. doi:10.1038/sj.emboj.7601425.
- Schüz, Almut, und Günther Palm. 1989. „Density of Neurons and Synapses in the Cerebral Cortex of the Mouse". *The Journal of Comparative Neurology* 286 (4): 442–55. doi:10.1002/cne.902860404.
- Schweizer, Felix E., und Timothy A. Ryan. 2006. „The Synaptic Vesicle: Cycle of Exocytosis and Endocytosis". *Current Opinion in Neurobiology* 16 (3): 298–304. doi:10.1016/j.conb.2006.05.006.
- Sengul, Gulgun, Ralph B. Puchalski, und Charles Watson. 2012. „Cytoarchitecture of the Spinal Cord of the Postnatal (P4) Mouse". *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 295 (5): 837–45. doi:10.1002/ar.22450.
- Sengul, Gulgun, und Charles Watson. 2012. „Chapter 13 - Spinal Cord A2 - Puelles, Charles WatsonGeorge PaxinosLuis". In *The Mouse Nervous System*, 424–58. San Diego: Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123694973100135>.
- Shin, Ok-Ho. 2014. „Exocytosis and Synaptic Vesicle Function". *Comprehensive Physiology* 4 (1): 149–75. doi:10.1002/cphy.c130021.
- Shpetner, Howard S., Jonathan S. Herskovits, und Richard B. Vallee. 1996. „A Binding Site for SH3 Domains Targets Dynamin to Coated Pits". *The Journal of Biological Chemistry* 271 (1): 13–16.
- Sillitoe, Roy V., YuHong Fu, und Charles Watson. 2012. „Chapter 11 - Cerebellum A2 - Puelles, Charles WatsonGeorge PaxinosLuis". In *The Mouse Nervous System*, 360–97. San Diego: Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123694973100111>.
- Sinha, Satyabrata, Anurima Majumder, Marycharmain Belcastro, Maxim Sokolov, und Nikolai O. Artemyev. 2013. „Expression and Subcellular Distribution of UNC119a, a Protein Partner of Transducin α Subunit in Rod Photoreceptors". *Cellular Signalling* 25 (1): 341–48. doi:10.1016/j.cellsig.2012.10.005.
- Singh, Mahaveer, Hemant R. Jadhav, und Tanya Bhatt. 2017. „Dynamin Functions and Ligands: Classical Mechanisms Behind". *Molecular Pharmacology* 91 (2): 123–34. doi:10.1124/mol.116.105064.
- Smillie, Karen J., und Michael A. Cousin. 2005. „Dynamin I Phosphorylation and the Control of Synaptic Vesicle Endocytosis". *Biochemical Society Symposium*, Nr. 72: 87–97.
- Soda, Keita, Daniel M. Balkin, Shawn M. Ferguson, Summer Paradise, Ira Milosevic, Silvia Giovedi, Laura Volpicelli-Daley, u. a. 2012. „Role of dynamin, synaptojanin, and endophilin in podocyte foot processes". *The Journal of Clinical Investigation* 122 (12): 4401–11. doi:10.1172/JCI65289.
- Soykan, Tolga, Natalie Kaempf, Takeshi Sakaba, Dennis Vollweiter, Felix Goerdeler, Dmytro Puchkov, Natalia L. Kononenko, und Volker Haucke. 2017. „Synaptic Vesicle

- Endocytosis Occurs on Multiple Timescales and Is Mediated by Formin-Dependent Actin Assembly". *Neuron* 93 (4): 854–866.e4. doi:10.1016/j.neuron.2017.02.011.
- Soykan, Tolga, Tanja Maritzen, und Volker Haucke. 2016. „Modes and Mechanisms of Synaptic Vesicle Recycling". *Current Opinion in Neurobiology* 39 (August): 17–23. doi:10.1016/j.conb.2016.03.005.
- Stimpson, Helen E. M., Christopher P. Toret, Aaron T. Cheng, Barbara S. Pauly, und David G. Drubin. 2009. „Early-Arriving Syp1p and Ede1p Function in Endocytic Site Placement and Formation in Budding Yeast". *Molecular Biology of the Cell* 20 (22): 4640–51. doi:10.1091/mbc.E09-05-0429.
- Sudhof, Thomas C. 2004. „The Synaptic Vesicle Cycle". *Annual Review of Neuroscience* 27: 509–47. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412.
- Sundborger, Anna, Cynthia Soderblom, Olga Vorontsova, Emma Evergren, Jenny E. Hinshaw, und Oleg Shupliakov. 2011. „An endophilin–dynamin complex promotes budding of clathrin-coated vesicles during synaptic vesicle recycling". *Journal of Cell Science* 124 (1): 133–43. doi:10.1242/jcs.072686.
- Sweitzer, Sharon M., und Jenny E. Hinshaw. 1998. „Dynamin Undergoes a GTP-Dependent Conformational Change Causing Vesiculation". *Cell* 93 (6): 1021–29.
- Takei, Kohji, Olaf Mundigl, Laurie Daniell, und Pietro De Camilli. 1996. „The Synaptic Vesicle Cycle: A Single Vesicle Budding Step Involving Clathrin and Dynamin". *The Journal of Cell Biology* 133 (6): 1237–50.
- Tan, Timothy C., Valentina A. Valova, Chandra S. Malladi, Mark E. Graham, Leise A. Berven, Orla J. Jupp, Gurdeep Hansra, u. a. 2003. „Cdk5 Is Essential for Synaptic Vesicle Endocytosis". *Nature Cell Biology* 5 (8): 701–10. doi:10.1038/ncb1020.
- Tian, Ning. 2004. „Visual Experience and Maturation of Retinal Synaptic Pathways". *Vision Research* 44 (28): 3307–16. doi:10.1016/j.visres.2004.07.041.
- Tomizawa, Kazuhito, Satoshi Sunada, Yun-Fei Lu, Yoshiya Oda, Masahiro Kinuta, Toshio Ohshima, Taro Saito, u. a. 2003. „Cophosphorylation of Amphiphysin I and Dynamin I by Cdk5 Regulates Clathrin-Mediated Endocytosis of Synaptic Vesicles". *The Journal of Cell Biology* 163 (4): 813–24. doi:10.1083/jcb.200308110.
- Tosini, Gianluca, und Michael Menaker. 1996. „Circadian Rhythms in Cultured Mammalian Retina". *Science (New York, N.Y.)* 272 (5260): 419–21.
- Tosini, Gianluca, Alec J. Davidson, Chiaki Fukuhara, Manami Kasamatsu, und Oscar Castanon-Cervantes. 2007. „Localization of a Circadian Clock in Mammalian Photoreceptors". *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (14): 3866–71. doi:10.1096/fj.07-8371com.
- Trepel. 2015. *Neuroanatomie (6.A.)*. 6. Auflage. Elsevier.
- Ungewickell, Ernst, Huberta Ungewickell, Susanne E. Holstein, Robert Lindner, Kondury Prasad, Winfred Barouch, Beth Martin, Lois E. Greene, und Evan Eisenberg. 1995. „Role of Auxilin in Uncoating Clathrin-Coated Vesicles". *Nature* 378 (6557): 632–35. doi:10.1038/378632a0.
- Vancura, Patrick, Tanja Wolloscheck, Kenkichi Baba, Gianluca Tosini, P. Michael Iuvone, und Rainer Spessert. 2016. „Circadian and Dopaminergic Regulation of Fatty Acid Oxidation Pathway Genes in Retina and Photoreceptor Cells". *PloS One* 11 (10): e0164665. doi:10.1371/journal.pone.0164665.

- Wahl, Silke, Rashmi Katiyar, und Frank Schmitz. 2013. „A Local, Periaxial Zone Endocytic Machinery at Photoreceptor Synapses in Close Vicinity to Synaptic Ribbons“. *The Journal of Neuroscience* 33 (25): 10278–300. doi:10.1523/JNEUROSCI.5048-12.2013.
- Wahl, Silke, Venkat Giri Magupalli, Mayur Dembla, Rashmi Katiyar, Karin Schwarz, Louise Köblitz, Kannan Alpadi, u. a. 2016. „The Disease Protein Tulp1 Is Essential for Periaxial Zone Endocytosis in Photoreceptor Ribbon Synapses“. *The Journal of Neuroscience* 36 (8): 2473–93. doi:10.1523/JNEUROSCI.2275-15.2016.
- Watanabe, Shigeki, Qiang Liu, M. Wayne Davis, Gunther Hollopeter, Nikita Thomas, Nels B. Jorgensen, und Erik M. Jorgensen. 2013. „Ultrafast Endocytosis at Caenorhabditis Elegans Neuromuscular Junctions“. *ELife* 2 (September): e00723. doi:10.7554/eLife.00723.
- Watanabe, Shigeki, Benjamin R. Rost, Marcial Camacho-Pérez, M. Wayne Davis, Berit Söhl-Kielczynski, Christian Rosenmund, und Erik M. Jorgensen. 2013. „Ultrafast Endocytosis at Mouse Hippocampal Synapses“. *Nature* 504 (7479): 242–47. doi:10.1038/nature12809.
- Watson, Charles. 2012. „Chapter 25 - Visual System A2 - Puelles, Charles WatsonGeorge PaxinosLuis“. In *The Mouse Nervous System*, 646–52. San Diego: Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123694973100251>.
- Wenk, Markus R., Lorenzo Pellegrini, Vadim A. Klenchin, Gilbert Di Paolo, Sungho Chang, Laurie Daniell, Manabu Arioka, Thomas F. Martin, und Pietro De Camilli. 2001. „PIP Kinase $\text{I}\gamma$ Is the Major PI(4,5)P₂ Synthesizing Enzyme at the Synapse“. *Neuron* 32 (1): 79–88.
- Whelan, James P., und James F. McGinnis. 1988. „Light-Dependent Subcellular Movement of Photoreceptor Proteins“. *Journal of Neuroscience Research* 20 (2): 263–70. doi:10.1002/jnr.490200216.
- Wigge, Patrick, Katinka Köhler, Yvonne Vallis, Christopher A. Doyle, David Owen, Stephen P. Hunt, und Harvey T. McMahon. 1997. „Amphiphysin Heterodimers: Potential Role in Clathrin-Mediated Endocytosis“. *Molecular Biology of the Cell* 8 (10): 2003–15.
- Wolloscheck, Tanja, Stefanie Kunst, Debra K. Kelleher, und Rainer Spessert. 2015. „Transcriptional Regulation of Nucleoredoxin-like Genes Takes Place on a Daily Basis in the Retina and Pineal Gland of Rats“. *Visual Neuroscience* 32 (Januar): E002. doi:10.1017/S0952523814000352.
- Wu, Ling-Gang, Edaeni Hamid, Wonchul Shin, und Hsueh-Cheng Chiang. 2014. „Exocytosis and Endocytosis: Modes, Functions, and Coupling Mechanisms“. *Annual Review of Physiology* 76: 301–31. doi:10.1146/annurev-physiol-021113-170305.
- Wu, Ling-Gang, Timothy A. Ryan, und Leon Lagnado. 2007. „Modes of Vesicle Retrieval at Ribbon Synapses, Calyx-Type Synapses, and Small Central Synapses“. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (44): 11793–802. doi:10.1523/JNEUROSCI.3471-07.2007.
- Wu, Xin-Sheng, Benjamin D. McNeil, Jianhua Xu, Junmei Fan, Lei Xue, Ernestina Melicoff, Roberto Adachi, Li Bai, und Ling-Gang Wu. 2009. „Ca²⁺ and Calmodulin Initiate All Forms of Endocytosis during Depolarization at a Nerve Terminal“. *Nature Neuroscience* 12 (8): 1003–10. doi:10.1038/nn.2355.

-
- Wu, Xin-Sheng, und Ling-Gang Wu. 2014. „The Yin and Yang of Calcium Effects on Synaptic Vesicle Endocytosis“. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34 (7): 2652–59. doi:10.1523/JNEUROSCI.3582-13.2014.
- Xue, Jing, Mark E. Graham, Aimee E. Novelle, Nancy Sue, Noah Gray, Mark A. McNiven, Karen J. Smillie, Michael A. Cousin, und Phillip J. Robinson. 2011. „Calcineurin Selectively Docks with the Dynamin Ixb Splice Variant to Regulate Activity-dependent Bulk Endocytosis“. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (35): 30295–303. doi:10.1074/jbc.M111.273110.
- Yamashita, Takayuki. 2012. „Ca²⁺-Dependent Regulation of Synaptic Vesicle Endocytosis“. *Neuroscience Research* 73 (1): 1–7. doi:10.1016/j.neures.2012.02.012.
- Yang, Jia-Shu, Leiliang Zhang, Stella Y. Lee, Helge Gad, Alberto Luini, und Victor W. Hsu. 2006. „Key Components of the Fission Machinery Are Interchangeable“. *Nature Cell Biology* 8 (12): 1376–82. doi:10.1038/ncb1503.
- Yao, Jun, Sung E. Kwon, Jon D. Gaffaney, F. Mark Dunning, und Edwin R. Chapman. 2012. „Uncoupling the Roles of Synaptotagmin I during Endo- and Exocytosis of Synaptic Vesicles“. *Nature Neuroscience* 15 (2): 243–49. doi:10.1038/nn.3013.
- Yao, Pamela J., Min Zhu, Eunice I. Pyun, Andrew I. Brooks, Stavros Therianos, Victoria E. Meyers, und Paul D. Coleman. 2003. „Defects in Expression of Genes Related to Synaptic Vesicle Trafficking in Frontal Cortex of Alzheimer’s Disease“. *Neurobiology of Disease* 12 (2): 97–109.
- Zhang, Jimmy Z., Bazbek A. Davletov, Thomas C. Südhof, und Richard G. Anderson. 1994. „Synaptotagmin I Is a High Affinity Receptor for Clathrin AP-2: Implications for Membrane Recycling“. *Cell* 78 (5): 751–60.
- Zheng, Jie, Sean M. Cahill, Mark A. Lemmon, David Fushman, Joseph Schlessinger, und David Cowburn. 1996. „Identification of the Binding Site for Acidic Phospholipids on the PH Domain of Dynamin: Implications for Stimulation of GTPase Activity“. *Journal of Molecular Biology* 255 (1): 14–21. doi:10.1006/jmbi.1996.0002.
- Zhu, Yongling, Jian Xu, und Stephen F. Heinemann. 2009. „Two Pathways of Synaptic Vesicle Retrieval Revealed by Single-Vesicle Imaging“. *Neuron* 61 (3): 397–411. doi:10.1016/j.neuron.2008.12.024.
- Züchner, Stephan, Maher Nouredine, Marina Kennerson, Kristien Verhoeven, Kristl Claeys, Peter De Jonghe, John Merory, u. a. 2005. „Mutations in the Pleckstrin Homology Domain of Dynamin 2 Cause Dominant Intermediate Charcot-Marie-Tooth Disease“. *Nature Genetics* 37 (3): 289–94. doi:10.1038/ng1514.

6 Abkürzungsverzeichnis

ADBE	activity-dependent bulk endocytosis
BAR-Domäne	BIN-Amphiphysin-Rvs-Domäne
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CME	clathrin-mediated endocytosis = Clathrin-vermittelte Endozytose
C-terminal	Carboxyterminal
CtBP2	C-terminal Binding Protein 2
ECL	Enhanced Chemoluminescence
i.e.	id est
et al.	et alii (und andere)
GCL	ganglion cell layer (Stratum ganglionare retinae)
G	Stratum granulosum
G-Domäne	GTPase-Domäne
grau (g)	graue Substanz
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Familie von Hydrolasen, die Guanosintriphosphat binden und spalten
ILM	inner limiting membrane (Membrana limitans interna)
INL	inner nuclear layer (Stratum nucleare internum)
IPL	inner plexiform layer (Stratum plexiforme internum)
IS	inner segment (Innensegment)
kDa	kilo Dalton

M	Stratum moleculare
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
NPG	N-Propylgallat
N-terminal	Amino-terminal
OFL	optic fiber layer (Stratum neurofibrarum)
OLM	outer limiting membrane (Membrana limitans externa)
ONL	outer nuclear layer (Stratum nucleare externum)
OPL	outer plexiform layer (Stratum plexiforme externum)
OS	outer segment (Außensegment)
P	Stratum purkinjense
PBS	Phosphate Buffered Saline
PH-Domäne	Pleckstrin Homologie Domäne
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P ₂)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH3-Domäne	SRC Homologie 3-Domäne
SV2	synaptisches Vesikelprotein 2
weiß (w)	weiße Substanz
ZNS	zentrales Nervensystem

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schema des Aufbaus der Kleinhirnrinde.....	13
Abbildung 2. Schematischer Aufbau des Neocortexes	16
Abbildung 3. Die wichtigsten Zellen der Retina mit ihren Verbindungen	20
Abbildung 4. Schematischer Aufbau der grauen Substanz des Rückenmarks	23
Abbildung 5. Ablauf der Clathrin-abhängigen Endozytose.....	28
Abbildung 6. Aktivitätsabhängige Endozytose synaptischer Vesikel.....	30
Abbildung 7. Struktur und Organisation von Dynamin	32
Abbildung 8. Dot blotexperimente mit Anti-Dynamin 1xb.....	50
Abbildung 9. Ladungskontrolle mit Anti-Aktin und Detektion von Dynamin mit Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) in Western Blot Analysen.....	52
Abbildung 10. Präabsorptionsexperimente in Western Blot Analysen	54
Abbildung 11. Lokalisation von Dynamin 1xb im cerebellären Cortex der Maus	56
Abbildung 12. Verteilung von Dynamin 1xb und RIM 1/2 im Cerebellum der Maus.....	57
Abbildung 13. Verteilung von Dynamin 1xb im Stratum moleculare.....	57
Abbildung 14. Vorkommen von Dynamin 1xb im Stratum purkinjense	58
Abbildung 15. Verteilung von Dynamin 1xb im Stratum granulosum	59
Abbildung 16. Doppelimmunfluoreszenzfärbung von Dynamin 1xb und Synaptotagmin 1 im cerebellären Cortex	60
Abbildung 17. Verteilung von Dynamin 1xb und Synaptotagmin im Cerebellum der Maus	61

Abbildung 18. Präabsorptionsexperimente des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers im Cerebellum der Maus	62
Abbildung 19. Detailaufnahmen der Kontrollexperimente mit Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) und Anti-panSV2.....	64
Abbildung 20. Lokalisation von Dynamin 1xb in der Retina	65
Abbildung 21. Präabsorptionsexperimente des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers in der Retina der Maus. Übersichtsaufnahme (Legende auf der nächsten Seite)	66
Abbildung 22. Präabsorptionsexperimente des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers in der Retina der Maus. Übersichtsaufnahme aus der OPL	67
Abbildung 23. Präabsorptionsexperimente des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers in der Retina der Maus. Detailaufnahme aus der OPL.....	68
Abbildung 24. Lokalisation von Dynamin 1xb im visuellen Cortexes der Maus	69
Abbildung 25. Präabsorptions- und Kontrollexperimente des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers im visuellen Cortex der Maus.....	72
Abbildung 26. Dynamin 1xb und RIM 1/2 in der grauen Substanz des Rückenmarks der Maus	74
Abbildung 27. Verteilung Dynamin 1xb und RIM 1/2 in der grauen und weißen Substanz des Mause Rückenmarks	75
Abbildung 28. Synaptotagmin 1 und Dynamin1xb in der grauen und weißen Substanz des Rückenmarks der Maus	76
Abbildung 29. Verteilung von Dynamin 1xb und β -Tubulin in der grauen und weißen Substanz des Mause Rückenmarks.....	77
Abbildung 30 Präabsorptions- und Kontrollexperimente des Anti-Dynamin 1xb (Klon 1E10) Antikörpers im Rückenmark.....	79
Abbildung 31. Quantifizierung synaptischer Dynamin 1xb Immunsignale in hell-und dunkeladaptierter Retina.....	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Zellen des cerebellären Cortexes	13
---	----

8 Danksagung

Meine tiefe Dankbarkeit gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr.med. Frank Schmitz, der mich im Schaffensprozess dieser Doktorarbeit immer unterstützt und mein Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten geweckt hat.

Weiter möchte ich meinen beiden Betreuerinnen, Dr. rer. nat. Silke Wahl und Dr. rer. nat. Karin Schwarz für die Einführung in die wissenschaftliche Laborarbeit und ihre immer währende Unterstützung danken.

Mein Dank gilt außerdem besonders Dr. rer. nat Mayur Dembla, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Ebenso danke ich Ekta Dembla, Shweta Suiwal und Dr. rer. nat Rashmi Katiyar für ihre Unterstützung.

Ich danke Gabi Kiefer, Silvia Brundaler und Ines Krüger für die exzellente technische Unterstützung.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, meinen Eltern Dr. med. Nikolina Beatrix Maria Russeff-Eich und Dr. theol. Klaus-Gerd Eich und meiner Schwester Lena Susanne Eich für ihre rückhaltlose Unterstützung und Liebe. Ich danke meiner Tante Susanne Eich und meinem Onkel Conrad Becker für die Unterstützung meiner akademischen Laufbahn und die zahlreichen Türen, die sich dank ihrer Hilfe für mich geöffnet haben. Außerdem danke ich meinen Großeltern Toni Eich und Gisela Eich sowie Martha Russeff für ihre Unterstützung.

Ich bedanke mich darüber hinaus bei allen anderen Menschen, die mich in dieser Zeit durch anregende Gespräche, Erfahrungen und Ratschläge sowohl wissenschaftlich als auch persönlich weiter gebracht haben.

9 Publikationen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde folgendes Manuskript zur Publikation im Journal „Frontiers in Molecular Neuroscience“ akzeptiert:

Eich Marie-Lisa, Ekta Dembla, Silke Wahl, Mayur Dembla, Karin Schwarz and Frank Schmitz. „The calcineurin-binding, activity-dependent splice variant dynamin 1xb is highly enriched in synapses in various regions of the central nervous system“.

Weitere Publikationen:

Eich Marie-Lisa, Lars Dyrskjøt, und George J. Netto. 2017. „Toward Personalized Management in Bladder Cancer: The Promise of Novel Molecular Taxonomy“. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, April. doi:10.1007/s00428-017-2119-x.

Rodriguez Pena, Maria Del Carmen, Aline C. Tregnago, **Marie-Lisa Eich**, Simeon Springer, Yuxuan Wang, Diana Taheri, Dilek Ertoy, u. a. 2017. „Spectrum of Genetic Mutations in de Novo PUNLMP of the Urinary Bladder“. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, Juni. doi:10.1007/s00428-017-2164-5.